Aus dem Institut für Blutgerinnung
und Transfusionsmedizin
der Medizinischen Einrichtungen
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Brüster

Untersuchungen zur Bestimmung des Hepatitis B-Oberflächen-Antigens (HBsAG) im Enzymimmunoassay

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Luxem aus Düsseldorf

1980

Aus dem Institut für Blutgerinnung
und Transfusionsmedizin
der Medizinischen Einrichtungen
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Brüster

Untersuchungen zur Bestimmung des Hepatitis B-Oberflächen-Antigens (HBsAG) im Enzymimmunoassay

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Luxem aus Düsseldorf

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez: Prof. Dr. Krüskemper

Referent:
gez: Prof. Dr. Brüster

Korreferent:
gez: Prof. Dr. Schulte

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0057

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung:	
Die Bluttransfusion und ihre Risiken	2
Virusbedingte Lebererkrankungen	7
Geschichtlicher Überblick	9
Nomenklatur	12
Die verschiedenen immunologischen Methoden zum Nachweis des HBsAG	14
Testprinzip und Aufgabenstellung	17
Materialien und Methoden	19
Photometrische Bestimmung und statistische Auswertung der Testergebnisse	2o
Fehlermöglichkeiten	21
Ergebnisse:	
Die Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration der Schwefelsäure	22
Die Zeitabhängigkeit der verschiedenen Inkubationen	24
Die Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Inkubationen	3o
Versuch der zeitlichen Verkürzung der Methode	35
Die Abhängigkeit der Extinktionen vom Inkubationsmodus	37
Vergleich von Originalmethode und Modifikation	39
Einfluß von Heparin und Vergleich mit dem RIA	41
Diskussion	43
Zusammenfassung	45
Literaturverzeichnis	46

EINLEITUNG

DIE BLUTTRANSFUSION UND IHRE RISIKEN

Bereits im 17. Jahrhundert wurden in England Bluttransfusionen von Tier zu Tier und auch von Tier zu Mensch vorgenommen, wobei letztere nahezu ausnahmslos mit tödlichem Ausgang behaftet waren. Erst die Entdeckung der Blutgruppen durch LANDSTEINER (1) schuf die Voraussetzung für gefahrlose und erfolgreiche Bluttransfusionen. So kann man erst die Blutübertragungen von Mensch zu Mensch nach dieser Entdeckung als den Beginn einer brauchbaren Therapie bezeichnen. Damals begegnete die Übertragung von menschlichem Blut begreiflicherweise noch großen Widerständen. Anfangs wurde lediglich defibriniertes Blut verwandt; später brachte die Entdeckung geeigneter Substanzen für die Blutkonservierung weitere Fortschritte (2).

In den letzten drei Jahrzehnten hat die Transfusionsmedizin eine quantitativ wie qualitativ außerordentliche Entwicklung genommen. Insbesondere hat die in steigendem Ausmaß ermöglichte Konservierung des Blutes den Weg geebnet, um auch in kleinen Krankenhäusern und sogar in der freien Praxis Blutübertragungen ohne große technische Schwierigkeiten durchzuführen. Durch die Vereinfachung der Transfusionstechnik kann heute bedeutend mehr Menschen geholfen und das Leben gerettet werden als dies früher der Fall war. Mit der quantitativen Entwicklung von Bluttransfusionen und deren Nutzbarmachung für kleine Krankenhäuser und freie Praxen ist auf der anderen Seite aber auch die Gefahr gewachsen, daß ohne ausreichende Kenntnisse der Blutgruppenbestimmung, der Transfusionssicherung, der Indikationsstellung und der Verhütung von Reaktionen Transfusionen durchgeführt werden. Jeder Arzt, der eine Blutübertragung anordnet, muß sich aus diesem Grunde darüber im klaren sein, daß er damit die Verantwortung für einen eventuell nicht ungefährlichen Eingriff übernimmt (3).

Im Blutspendewesen werden Gelegenheitsspender und Dauerspender unterschieden, wobei Gelegenheitsspender nicht häufiger als zweimal im Jahr Blut spenden. Dauerspender sind Personen, die sich zum Blutspenden bereit erklären und die auf Anforderung häufiger als zweimal im Jahr Blut spenden (4). Jeder Spender, gleichgültig ob Dauer- oder Gelegenheitsspender, sollte vor einer Blutentnahme untersucht werden, um eine eventuelle Krankheitsübertragung auf den Empfänger zu verhindern und den Spender vor der Aktivierung nicht erkannter krankhafter Prozesse zu schützen. Wegen des Polymorphismus des Menschen gegen erythrozytäre, leukozytäre und plasmatische Bestandteile hat die Spenderuntersuchung bei der Anamnese folgende Punkte zu berücksichtigen: Frühere Krankheiten, die auch nach ihrer klinischen Ausheilung über das Blut weiterhin ansteckend sein können, wie in erster Linie Serumhepatitis, Malaria, Lues, Fünftagefieber und Brucellose, eventuell auch Typhus, Paratyphus, andere Salmonellenerkrankungen und Rickettsiosen (z.B. Fleckfieber). Darüberhinaus sind möglicherweise rezidivierende Erkrankungen zu erfragen, wie zum Beispiel die Tuberkulose. Auch Krankheiten, die gewisse Schäden hinterlassen können, wie zum Beispiel Nierenerkrankungen, Diphtherie und andere müssen anamnestisch erhoben werden. Die Spender sollten das 18. Lebensjahr vollendet haben und nicht über 65 Jahre alt sein (4/1).

Mit dem Blut können folgende Krankheitserreger übertragen werden (1/5):

1. Protozoen: Die Malaria ist die bedeutendste der durch Protozoen verursachten und übertragenen Krankheiten. Als ihr Erreger ist Plasmodium malariae bekannt. Personen, die anamnestisch bereits eine Malaria durchgemacht haben, sind aus dem Spenderkreis auszuschließen. Im anfallsfreien Intervall fällt der Nachweis von Plasmodien äußerst schwer; so bieten die anamnestischen Angaben der Spender oft den einzigen Anhalt. Ist man einmal auf einen malariaverdächtigen Spender angewiesen, sollen laut Vorschlag der WHO einige Stunden vor der Blutentnahme 600 mg Chloroquinphosphat verabreicht werden (1/5).

2. Spirochäten: Hier muß die Syphilis als die wichtigste der durch Spirochäten verursachten und übertragenen Erkrankungen genannt

werden. Jeder Syphilitiker muß als Blutspender ausgeschlossen werden. Gesetzlich vorgeschrieben muß ein serologischer Luestest (z.B. CMT-Cardiolipin-Flockungstest oder TPHA), der nicht länger als sechs Wochen zurückliegt, beim Spender negativ ausfallen, um den Empfänger vor einer Luesinfektion schützen zu können. Bei Frischblutübertragungen wird ein Luesschnelltest verlangt (1/4/5).

3. Bakterien können auf zweierlei Arten Transfusionsreaktionen verursachen. Einerseits können sie Transfusionsgefäße und Stabilisatoren, die für die Transfusionen benutzt werden, aber noch nicht sterilisiert wurden, kontaminieren. Nach der Sterilisation bleiben die Transfusionsgefäße und Stabilisatoren weiterhin kontaminiert mit hitzestabilen bakteriellen Produkten (meist Polysaccharide, aber auch andere organische und anorganische Substanzen), die fiebrige Reaktionen verursachen können, wenn sie in den menschlichen Blutkreislauf gelangen. Andererseits können die Bakterien, die Transfusionsgefäße und Stabilisatoren bereits verschmutzt haben, die Sterilisation überleben. Auch nach der Sterilisation können sie Stabilisatoren und Transfusionsgefäße kontaminieren, und sie können während der Venaesectio in den Transfusionsbehälter gelangen. Die Reaktionen sind dem anaphylaktischen Schock ähnlich und verlaufen meist tödlich. Ursache dieser Reaktionen sind meist gramnegative Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe (1/5).

Von den durch Bluttransfusionen übertragenen bakteriellen Erkrankungen ist die Brucellose besonders hervorzuheben. Ein Spender, der eine Brucellose durchgemacht hat, sollte von der Blutspende ausgeschlossen werden (1/5).

4. Viren: Die Bedeutsamste der Viruskrankheiten, die durch Bluttransfusionen übertragen werden können, ist die Serumhepatitis, denn ihre Letalität ist mit 11-12% außerordentlich hoch. Die Entdeckung, daß die Träger der Serumhepatitis ein Antigen - das Australia-Antigen - im Plasma haben (s.u.), hat zu einer Reihe von Tests geführt, durch die die infektiösen Spender identifiziert werden können. Zur Feststellung der Spendetauglichkeit ist mindestens ein Test, sofern dieser geeignet scheint, das Risiko der Hepatitisübertragung einzuschränken (z.B. Enzymteste oder Radioimmunoassay),

durchzuführen. Ein jeder Spender sollte zu jedem Spendetermin erneut auf das Australia-Antigen getestet werden. Da Personen, die eine Serumhepatitis durchgemacht haben, noch sehr lange Träger des Erregers sein können, dürfen Spender mit einer Serumhepatitisanamnese grundsätzlich nicht zum Blutspenden zugelassen werden (1/4/5).

Ferner ließ sich nachweisen, daß das Epstein-Barr-Virus durch Blutransfusionen übertragen werden kann (6). Das dabei auftretende Postinfektionssyndrom ähnelt der infektiösen Mononukleose. Der Anstieg des Epstein-Barr-Virus-Antikörpertiters bei den Empfängern kann als Beweis angesehen werden.

Über das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern mit dem Blut hinaus ist noch auf folgende Risikofaktoren beim Spender zu achten (1/5): Allergische Reaktionen verlaufen relativ ungefährlich. Sie gelten als häufigste Ursache erhöhter Temperatur während oder nach Bluttransfusionen. Grundlage für solche Zwischenfälle ist die Überempfindlichkeit des Empfängers gegen Plasmaeiweißkörper des Spenders, was durch gehäuftes Auftreten nach wiederholten Bluttransfusionen bestätigt wird.

Folgenschwerer als diese Störung ist die durch Transfusion gruppenfremder Erythrozyten hervorgerufene Sensibilisierung des Empfängers. Hierbei kann es sogar zu hämolytischen Transfusionszwischenfällen kommen.

Ferner ist auf nur kurze Zeit zurückliegende Schutzimpfungen des Spenders (Tetanus etc.) zu achten, da sein Blut einerseits noch Spuren eines verabreichten Tierserums enthalten kann und er selbst andererseits hämolytisch wirkende Blutgruppen-Antikörper entwickeln kann. Letztlich ist noch auf Spender mit erythrozytären Anomalien zu achten. Hier sind insbesondere drei Gruppen wichtig: Glukose-6-Phosphatase-Dehydrogenase-Mangel, Thalassämie und Polyzythämia vera (1/5).

Von vorneherein ist auf eine strenge Blutgruppen- und Rh-Faktor-Übereinstimmung zu achten. Vorbedingung für jede Transfusion von menschlichem Blut ist die Blutgruppengleichheit zwischen Spender und Empfänger. Die Blutgruppengleichheit muß sich auf das ABO-System be-

ziehen. Die A-Untergruppen brauchen im allgemeinen bei der Blutübertragung nicht berücksichtigt zu werden, außer bei nachgewiesenem anti-A_1; doch sollten Spender- und Empfängerblut bezüglich des Rh-Systems unbedingt formelgleich oder formelverträglich sein. Darüberhinaus sollten bei allen rh-negativen (D-) Spendern zusätzlich noch die Antigene C und E untersucht werden, da nur diejenigen Personen als rh-negativ gelten (rh = ccddee), die auch C-negativ und E-negativ sind (1/4).

VIRUSBEDINGTE LEBERERKRANKUNGEN

Folgende Formen der Hepatitis werden von Viren verursacht: Hepatitis A, Hepatitis B, Non A-B Hepatitiden, Epstein-Barr Mononukleose und Zytomegalie.

Hepatitis A und Hepatitis B sind durch folgende Unterschiede gekennzeichnet:

	Hepatitis A	Hepatitis B
Virus	IH oder A	SH oder B
Inkubation	15-6o Tage	6o-18o Tage
Inkubationsweg	oral, parenteral	parenteral, Schleimhautkontakt
Virusvorkommen	in Stuhl, Urin und Blut	in Blut, Tränenflüssigkeit, Urin und Speichel
Verlauf	leichter	meist schwerer
Hauptsächlicher Übertragungsfaktor	enger Kontakt, Trinkwasser und Schmierinfektion	medizinische Interventionen, Schmierinfektion und unbekannte Wege
Jahreszeitliche Häufung	Herbst/Winter	ganzes Jahr
Altersdisposition	Jugendliche	alle Altersstufen

Die Hepatitis B steht heute an fünfter Stelle der meldepflichtigen Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland und ist damit nach einigen bakteriellen Infektionskrankheiten die häufigste Viruskrankheit. Mit einer Frequenz in der Bundesrepublik Deutschland von 18ooo - 25ooo gemeldeten Fällen pro Jahr (offizielle Mitteilung der Krankenkassenverbände) erlangt diese Erkrankung eine ungeheure ökonomische Bedeutung (7).

GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK

Bereits im Talmud werden Erkrankungen der Leber - insbesondere die Gelbsucht - erwähnt. Auch Hippocrates hinterließ uns Beschreibungen des Erscheinungsbildes der Gelbsucht. Der kontagiöse Charakter der Gelbsucht wird wahrscheinlich zum erstenmal im 8. Jahrhundert n.C. in einem Brief von Papst Zacharias an den damaligen Erzbischof von Mainz, den Heiligen Bonifatius, schriftlich erwähnt (8).

Die erste genauere Beschreibung einer Gelbsuchtepidemie wurde 1791 von HERLITZ in Göttingen gegeben. Damals führte HERLITZ den Terminus "Icterus epidemicus" ein, obwohl bereits SYDENHAM (1624 - 1689) Beobachtungen über den epidemischen Charakter der Gelbsucht niedergeschrieben hatte. Damals wurde das Konzept der "epidemischen Gelbsucht" natürlich noch nicht akzeptiert (9).

1855 vertrat BAMBERGER (10) zum erstenmal die Ansicht, daß die katarrhalische Gelbsucht eine obstruktive und nicht eine intrahepatische Ursache habe. BAMBERGER vermutete als Hauptgrund für die Entstehung der katarrhalischen Gelbsucht eine Schwellung der Papilla Vateri. Diese Auffassung der Pathogenese wurde von VIRCHOW, FRÖHLICH und EPPINGER (11/12/13) ausgebaut, die alle über Fälle von Gelbsucht berichteten, bei denen obduktiv eine Schwellung des Choledochus oder der Papille gefunden worden war. EPPINGER lehrte sogar, daß jede Art von Gelbsucht eine obstruktive Ursache habe.

Dies ist erstaunlich, denn es war weithin bekannt, daß schon während des Mittelalters - insbesondere in Kriegen - epidemische Formen der Gelbsucht beobachtet worden waren (9).

Auch im zweiten Weltkrieg nahmen dann Epidemien von infektiöser Gelbsucht wieder ein außerordentliches Ausmaß an (14).

1890 kam FLINDT (15) zu der Meinung, daß die katarrhalische Gelbsucht eine Infektion darstelle, die generalisiert sei und die das Le-

berparenchym über den Blutstrom erreiche.

19o1 und wiederum 1918 schrieb MC DONALD (16/17), daß die infektiöse Gelbsucht wahrscheinlich durch einen Erreger hervorgerufen werde, der kleiner als ein Bakterium sei, und er stellte das Postulat auf, dieser sei ein Virus. Von nun an entwickelte sich die Vorstellung von der virologischen Ätiologie der infektiösen Gelbsucht immer weiter (18/19/2o).

Die Geschichte der Serumhepatitis ist wesentlich kürzer. LURMAN berichtete im Jahre 1885 als erster über einen Fall einer Serumhepatitisepidemie, die 1883 unter Hafenarbeitern in Bremen stattgefunden hatte (21). Weitere Berichte über gehäuft auftretende Fälle von Ikterus finden sich aus Diabetiker-Kliniken, von Krankenhäusern, in denen speziell venerische Erkrankungen behandelt wurden, und von Krankenhäusern, in denen Patienten mit rheumatoider Arthritis unter Injektionsbehandlung mit Gold standen (22/23/24). In all diesen Fällen hatten die Patienten intravenöse Injektionen erhalten.

Erst 1943 wurde von MC CALLUM auf einen gemeinsamen Faktor in den oben beschriebenen Fällen hingewiesen (25). Er stellte fest, daß die Gelbsucht durch Spritzen und ähnliches Material, das zwischen den einzelnen Injektionen nicht oder ungenügend sterilisiert worden war, von Patient zu Patient übertragen werden kann.

Zum endgültigen Beweis der Virus-Ätiologie der Hepatitis kam es während des zweiten Weltkrieges nach erfolgreicher Übertragung auf freiwillige Versuchspersonen (26/27/28/29). Während dieser frühen experimentellen Phase war es schwierig, eine klare Unterscheidung zwischen infektiöser Hepatitis und Serumhepatitis zu machen, da es an spezifischen Labortests fehlte. Bald jedoch wurden Unterschiede zwischen den beiden Hepatitisformen deutlich. Diese Unterschiede basierten hauptsächlich auf epidemiologischen Beobachtungen, insbesondere über den Infektionsweg und die Infektionszeit (siehe "Virusbedingte Lebererkrankungen"). Die Begriffe Hepatitis A für die infektiöse oder epidemische Hepatitis und Hepatitis B für die Serumhepatitis oder den homologen Serumikterus wurden 1947 von MC CALLUM eingeführt und 1973 von der WHO übernommen (3o/31).

Im Jahre 1964 gelang es BLUMBERG (32), erstmals ein Antigen zu beschreiben, das er bei einem australischen Ureinwohner gefunden hatte und das er mit dem Namen Australia-Antigen belegte. BLUMBERG schrieb diesem Antigen zunächst einmal den Charakter eines genetischen Polymorphismus zu. 1968 konnte PRINCE (33) dann den exakten Beweis erbringen, daß dieses Antigen eine virale Substanz darstellt und direkt der Hepatitis B zuzuordnen ist.

KAPLAN gelang es, neben diesem Antigen und zwei weiteren Antigenen, die für die Hepatitis B typisch sind (siehe "Nomenklatur"), eine Desoxyribonucleinsäure-Polymeraseaktivität im Serum von Patienten mit einer HBsAG-Infektion und in konzentrierten Präparationen nachzuweisen (34). HOLLAND (35) schreibt in einem Bericht, daß die Transfusion von HBsAG-positivem Blut bei 81 von 148 Patienten (55%) eine Serumhepatitis bewirkt hatte.

Bis heute ist nach den grundlegenden Entdeckungen von BLUMBERG und PRINCE zu Hepatitis B-Antigen und -Virus eine Vielzahl von weiteren Untersuchungen gemacht worden, die sowohl zur Aufklärung der Rolle des Antigens als auch der Rolle des Virus beigetragen haben. Dabei wurde auch das Virus selbst entdeckt und als Dane-Partikel bezeichnet. Es ist gelungen, die einzelnen serologisch erfassbaren Parameter in Korrelation zur Pathogenese der Erkrankung zu bringen. Der Nachweis, daß chronische Formen der Hepatitis - wie die chronisch-persistierende und die chronisch-aggressive Hepatitis - eine Folge der Infektion des Organismus mit diesem Erreger darstellen, ist ebenfalls gelungen. Die Züchtung des Erregers in der Gewebekultur allerdings ist noch nie gelungen; der Tierversuch ist sehr aufwendig und schließt größere Versuchsreihen bis jetzt noch aus, da er bisher nur mit dem Schimpansen gelungen ist (36).

NOMENKLATUR

Folgende Nomenklatur wird heute von einer Sachverständigengruppe der WHO offiziell vorgeschlagen (37):

1. Das HBV, das Hepatitis B-Virus. Die Untersuchung des Hepatitis B-Antigens (s.u.) im Elektronenmikroskop ergab nach negativer Färbung eine erhebliche morphologische Heterogenität der Partikel, deren virusartige Strukturen in drei grundsätzlichen Formen vorkommen. Die Hauptkomponente des Antigens ist ein sphäroides pleomorphes Partikel mit einem Durchmesser von 16 - 25 nm. Charakteristisch ist auch die Gegenwart von tubulären Formen (durchschnittlich 22 nm im Durchmesser und oft bis zu mehreren hundert nm an Länge). Die dritte Partikelform, der Dane-Partikel, ist ebenfalls sphäroid und 42 nm im Durchmesser. Es setzt sich aus einem Nucleoid zusammen mit einem inneren Anteil, dem 28 nm großen Core-Antigen (s.u.) und der DNS-Polymerase, und aus einer Schale aus Oberflächenantigen (s.u.) mit einer Dicke von 7 nm (9/38). Das Hepatitis B-Virus ist identisch mit diesem Dane-Partikel.

2. Das HBsAG, das Hepatitis B surface Antigen (also das Australia-Serumhepatitis-Antigen) an der Oberfläche (surface) der Dane-Partikel sowie der 16 - 25 nm-Partikel und der tubulären Formen. Inzwischen konnten acht Subtypen des HBsAG nachgewiesen werden. Sie sind genetisch determiniert und werden möglicherweise helfen , Infektionsketten nachzuweisen, da ihre regionale Verteilung sehr unterschiedlich ist. Die Subtypen haben ein gemeinsames gruppenspezifisches Antigen a und grundsätzlich die Subdeterminanten d oder y und w oder r. Auf einem Workshop in Paris vom 14.4. bis 18.4. 1975 erhielten sie eine neue Nomenklatur (39). Folgende Bezeichnungen wurden gewählt:

a_1 y(w)	a_2 ld(w)
a_2 ly(w)	a_3 d(w)
a_2 3y(w)	
a_3 y(w)	
ayr	adr

Dies gilt als Beweis dafür, daß die Subtypen der phänotypische Ausdruck der genotypischen Variante des Hepatitis B-Virus sind.

3. Das HBcAG, das Hepatitis B core Antigen, das im Kern (core) der Dane-Partikel liegt. Bei akuten Hepatitiden werden in der Regel kurz nach Beginn der Erkrankung noch während der Antigenämie Antikörper gegen das core der Dane-Partikel nachgewiesen, die nach Beendigung der Antigenämie sehr hohe Titer erreichen. Einige Personen bilden bei der Hepatitis B kein HBs-Antigen, aber ebenfalls als alleiniges Kriterium für die Infektion sehr hohe Anti-HBc-Titer. Dieses HBc-Antigen ist praktisch lebenslang im Serum dieser Personen nachweisbar, später in niedrigeren Titern. Es ist ein wertvoller Parameter für die Bestimmung der Durchseuchung einer Population (besser als HBs-Antigen). Das HBc-Antigen gilt also als Nachweis einer früheren Infektion.

4. Das HBeAG. Das von MAGNIUS und ESPMARK (4o) entdeckte HBeAG ist ebenso charakteristisch für die Hepatitis B und wahrscheinlich auch für die Infektiosität dieser Erkrankung. Nach Befunden von MAGNIUS und Mitarbeitern (41), SCHWEITZER und Mitarbeitern sowie OKADE und Mitarbeitern (42/43) scheint ein negativer HBe-Antigen-Befund auf eine niedrige oder fehlende Infektiosität HBs-Antigen-positiven Blutes hinzuweisen.

5. Das anti-HBs, der Antikörper gegen das HBsAG.

6. Das anti-HBc, der Antikörper gegen das HBcAG.

7. Das anti-HBe, der Antikörper gegen das HBeAG (44).

DIE VERSCHIEDENEN IMMUNOLOGISCHEN METHODEN ZUM NACHWEIS DES HBSAG

Das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen erscheint im Blut wenige Tage vor dem oder zum gleichen Zeitpunkt, an dem der Serum-Transaminasenspiegel zu steigen beginnt. Normalerweise erreicht die Antigenkonzentration ein Maximum, wenn sich die ersten Symptome zeigen; zu diesem Zeitpunkt kann man maximal 10^{12} Partikel pro ml Serum finden. Etwa sechs bis zwölf Wochen nach Abklingen der Symptome werden die meisten Patienten HBsAG-negativ.

Da das HBs-Antigen auch bei Serumhepatitiden und nach Bluttransfusionen gefunden wird, hat es eine ganz besondere Bedeutung im Blutspendewesen erhalten, zumal Risiko und Schwere anderer durch Bluttransfusion übertragbarer Krankheiten derzeit deutlich geringer ist.

Die verschiedenen immunologischen Methoden zum Nachweis des HBsAG sind: Immundiffusion nach Ouchterlony, Überwanderungselektrophorese, Komplementbindungsreaktion und Latextest als relativ unempfindliche Methoden sowie Elektronenmikroskopie, Hämagglutinationshemmtest, Radioimmunoassay und Enzymimmunoassay als wesentlich empfindlichere Nachweismethoden.

Im Vergleich zur Überwanderungselektrophorese hat die Immundiffusion nach Ouchterlony den Nachteil, im Nachweis des HBsAG wesentlich langsamer und unempfindlicher zu sein. Auf der anderen Seite verspricht die Immundiffusion nach Ouchterlony als einzige Methode eine absolute Identifikation des HBsAG.

Die Überwanderungselektrophorese ist lange Zeit zum Nachweis des HBsAG angewandt worden. Diese Methode basiert auf folgendem Prinzip: In einem elektrophoretischen Feld bewegt sich das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen in Richtung der Anode, während sich der Antikörper (anti-HBs) in Richtung der Kathode bewegt (Resultat des elektrophoretischen Flusses). Der größte Vorteil dieser Methode liegt in der Tat-

sache, daß die Tests innerhalb von zwei Stunden fertiggestellt werden können. Obwohl stark positive Reaktionen bereits zu diesem Zeitpunkt mit Leichtigkeit abgelesen werden können, ist es notwendig, das Gel wiederholt zu waschen und anzufärben, um schwach positive oder zweifelhafte Reaktionen eindeutig klassifizieren zu können.

Die Komplementbindungsreaktion ist im Nachweis des HBsAG empfindlicher als die Immundiffusion nach Ouchterlony und hat den Vorteil, Antigen-Antikörper-Komplexe nachzuweisen. Dennoch ist auch diese Methode mit verschiedenen Nachteilen behaftet.

Im Latextest werden Latexpartikel mit Antikörpern gegen das HBsAG beladen. Wesentliche Vorteile zum Nachweis des HBsAG kann aber auch diese Methode gegenüber den vorgenannten Tests nicht aufweisen.

Der Hämagglutinationshemmtest ist ein sehr empfindlicher Test, der auf folgendem Prinzip beruht: Die Agglutination von Erythrozyten, die in Gegenwart von $CrCl_3$ mit Hepatitis B-Oberflächen-Antigen markiert und durch Hepatitis B-Oberflächen-Antikörper gebunden sind, wird bereits durch sehr geringe Konzentrationen des Hepatitis B-Oberflächen-Antigens gehemmt. Die Empfindlichkeit dieses Tests zum Nachweis des HBsAG liegt im Empfindlichkeitsbereich der Komplementbindungsreaktion; seine Empfindlichkeit zum Nachweis des Hepatitis B-Oberflächen-Antikörpers ist etwa hundert mal stärker.

Die Elektronenmikroskopie ist angewandt worden zum Nachweis der Dane-Partikel (s.o.). In Anwesenheit von Antikörpern gegen das HBsAG dient sie dazu, die Agglutination der Dane-Partikel zu demonstrieren. Die Methode ist sehr wertvoll, wenn es darum geht, ein individuelles Ergebnis aus einem anderen Test zu festigen. Zum Routine-Gebrauch empfiehlt sie sich allerdings nicht (5).

Der Radioimmunoassay beruht auf dem Festphasenprinzip von CATT und TREAGER (45). 4 mm große Polystyrolkugeln sind mit Hepatitis B-Oberflächen-Antikörper vom Meerschweinchen beschichtet. Diese Kugeln werden mit Patientenserum inkubiert. Ist HBsAG vorhanden, so bindet es sich an den fixierten Meerschweinchen-Antikörper. Nach gründlichem Waschen werden die Kugeln mit einer Lösung inkubiert, die mit J^{125} markierte menschliche Antikörper enthält. Wurde vorher Antigen an die

Antikörper der Kugeln gebunden, so binden sich nun die markierten Antikörper an die fixierten Antikörper-Antigen-Komplexe. Nach erneutem Waschen werden die Kugeln in Zählröhrchen überführt, in denen die Radioaktivität mit Hilfe eines Gammaszintillationszählgerätes gemessen werden kann. Der Zeitbedarf für die Bearbeitung von 100 Blutproben (einschließlich der Zeit für die Gerinnung der Proben und die manuelle Lösung der Gerinnsel vom Rand der Röhrchen) beträgt acht Stunden. 1976 gelang es STUTE (46), durch Verwendung von Heparinplasma und durch Erhöhung der Reaktionstemperatur sowie Verwendung eines Schüttelwasserbades die Methode bei gleicher Empfindlichkeit deutlich zu verkürzen und bei gleichem Zeitaufwand deutlich empfindlicher zu gestalten, sodaß die Nachweisgrenze des HBsAG in wässrigen Lösungen bis in den Picogrammbereich gesenkt werden konnte.

Fast alle Blutspendedienste in der Bundesrepublik Deutschland wenden zum Nachweis des HBsAG im Blut den Radioimmunoassay (RIA) an. Dieser hat sich durch gute Empfindlichkeit und Spezifität sowie gute Standardisierung bewährt hat. Leider ist jedoch die Haltbarkeit der Testkits mit ^{125}J markierten Antikörpern wegen der Zerstrahlung des ^{125}J auf circa vier Wochen beschränkt. Ebenso ist die Verwendung radioaktiver Materialien mit einigen Problemen - wie eine Umgangsgenehmigung und Erfüllung der in der Strahlenschutzverordnung festgelegten Auflagen - verbunden. Seit einiger Zeit wird somit nach HBsAG-Nachweismethoden im Blut gesucht, die einerseits durch Verwendung von nicht radioaktivem Material eine längere Haltbarkeit und Umgehung der oben angeführten Problematik der Radioaktivität versprechen und andererseits mit gleich guter Empfindlichkeit sowie Spezifität wie der Radioimmunoassay behaftet sind.

Eine holländische Arbeitsgruppe (WOLTERS et al.) hat einen Enzymimmuntest entwickelt, der sich als eine solche Alternative zum RIA anbietet (47).

TESTPRINZIP UND AUFGABENSTELLUNG

Das Testprinzip im Immuntest wandten LING und OVERBY (48) erstmalig zum Nachweis des HBsAG an. Von Bakteriophagen (49), freien Radikalen (5o), fluoreszierenden Farbstoffen (51) und Enzymen (52) als Alternativen zu radioaktiven Isotopen erschienen WOLTERS und Mitarbeitern Enzyme wegen ihres Multiplikationseffektes am vielversprechendsten (53).

Der "Sandwich-Enzymimmunoassay" (Verwendung von enzymmarkiertem Antikörper und unlöslich gemachtem Antikörper) ist nur dann anwendbar, wenn Antigen und Antikörper mindestens zwei Bindungsstellen aufweisen; er ist also besonders geeignet zum Nachweis sehr großer infektiöser Antigene, wie es das HBsAG ist.

Folgendermaßen baut sich der "Sandwich-EIA" auf: Microtiterplatten sind mit Schaf-Antikörpern gegen HBsAG beschichtet - Festphasen-anti-HBs. Untersuchungsseren oder -plasmen werden in den Vertiefungen der Platten inkubiert (1.Inkubation). Ist in der Probe HBsAG vorhanden, so wird es an den fixierten Antikörper gebunden. Das nicht gebundene Material wird danach durch mehrmaliges Waschen und Absaugen entfernt. Nun fügt man einen zweiten löslichen, mit dem Enzym Meerrettichperoxydase (im Subnanogrammbereich photometrisch leicht nachweisbar und über Aminogruppen (54) und Zuckerreste (55) an andere Moleküle ankuppelbar) verbundene Antikörper hinzu (2. Inkubation). Dieser Antikörper wird an den in der ersten Inkubation gebildeten Festphasen-Antigen-Antikörper-Komplex gebunden (Fixation des Enzymmarkers an die Festphase). Auch hiernach erfolgt die Entfernung des ungebundenen Materials durch mehrmaliges Waschen und Absaugen. In einer dritten Inkubation fügt man ein passendes Enzymsubstrat hinza (Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid mit Harnstoff-Peroxid). Im Falle einer positiven HBsAG-Testprobe entsteht als Resultat der Enzymreaktion eine gelb-orange Farbe; im Falle einer negativen HBsAG-Testprobe

bleibt die Färbung aus. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird die Farbentwicklung beendigt. Die Testergebnisse lassen sich augenoptisch ablesen; darüberhinaus kann man die Extinktionen der Farblösungen photometrisch bestimmen.

Die bisherigen Arbeiten mit dem EIA (SEIDL, KÜHNER, TRAUTMANN und PADE, LANGE, KÖHLER, APODACA und SUCKER sowie GERLICH,STAMM und THOMSON) beschäftigten sich mit dem Vergleich der Empfindlichkeit von EIA und RIA (56/57/58).

Neben dieser Frage sollte in der vorliegenden Studie die folgende Problematik geklärt werden: Durch den im Vergleich zu den übrigen Qualitätskontrollen von Blutkonserven derzeit höchsten Stellenwert des HBsAG in der Prophylaxe transfusionsbedingter Krankheiten ist die Bestimmung des HBsAG wegen ihres Zeitaufwandes die limitierende Größe bei der Ausgabe von Blut. Da dem Klinker Blut und seine Bestandteile möglichst schnell zur Verfügung gestellt werden sollten, erschien es sinnvoll, nach einer verkürzten Modifikation des EIA zu suchen, die ohne Empfindlichkeits- und Spezifitätseinbuße bei gleich guter Reproduzierbarkeit arbeitete. Wegen des großen Zeitaufwandes für die Gerinnung der Proben und die manuelle Lösung der Gerinnsel vom Rand der Röhrchen sowie die Zentrifugation (Trennung des Blutkuchens vom Serum) erschien es ebenfalls sinnvoll, die Verwendungsmöglichkeit von Heparinplasma zu untersuchen. Diese beiden Fragestellungen lagen insbesondere aus dem Grunde nahe, weil es bereits gelungen war, für den Radioimmunoassay eine verkürzte Modifikation zu finden, die den o.g. Anforderungen entsprach, und weil die Verwendung von Heparin als Antikoagulans hier sogar zu einer Empfindlichkeitssteigerung geführt hatte (46).

MATERIALIEN UND METHODEN

Alle Untersuchungen auf HBsAG wurden mit einer positiven Kontrolle sowie deren Verdünnungen in antigennegativem Humanserum durchgeführt, die in ihrer Antigenkonzentration (18-2o ng (59)) der Kontrollprobe des Ausria II der Firma Abbott entsprach. Als negative Kontrollen dienten Seren und Plasmen von Blutspendern.

Microtiterplatten à llo Vertiefungen mit gegen HBsAG gerichteten Schaf-Antikörpern beschichtet, Ampullen mit lyophilisiertem Konjugat (enzymmarkierter Antikörper), Harnstoff-Peroxid-Tabletten, OPD-Tabletten (Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid), konzentrierte Waschflüssigkeit (Trispuffer), alles entsprechend dem Testkit, 11-Kanal Multipipette "Hepanostika", feinregulierbar von o,o5 bis o,2o ml (Fa. Organon Technika).

NH_3-Heparinröhrchen (Fa. Greiner), Glasküvetten mit o,2 cm Breite und 1,o cm Schichtdicke (Fa. Hellma).

Quecksilber-Spektrallinienphotometer (Eppendorf 1101 M) mit 492 nm-Filter (besonders günstig, da bei 492 nm das Absorptionsmaximum der Peroxidase liegt).

37, 45 und 5o°C thermostatisierte Wasserbäder mit einer Temperaturkonstanz von ±o,5°C, ein Schüttelwasserbad mit einer horizontalen Schüttelamplitude von 1 cm und einer Maximalfrequenz von 3oo Excursionen/Minute (Fa. Köttermann).

In Ergänzung zu den Originalvorschriften des Hepanostika-Microelisa-Systems wurden die Mengen und Konzentrationen für die dritte Inkubation geändert, um eine genügend große Messmenge für die o,3 ml-Küvette des Photometers zu erhalten (o,15 ml statt o,1o ml Substrat, o,15 ml 2,6 n statt o,o5 ml 4 n Schwefelsäure, Herstellung der OPD-Lösung mit 17 ml statt 15 ml destilliertem Wasser).

PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE

Zur statistischen Auswertung der photometrisch ermittelten Testergebnisse wird von Organon in Analogie zum Radioimmunoassay folgendes Prinzip empfohlen: Bei jeder Testplatte werden mehrere negative Kontrollen mitgeführt. Hiervon ermittelt man den Mittelwert. Alle Proben, deren Extinktion höher als das 2,1 fache dieses Mittelwertes ist, sind als positiv anzusehen.

FEHLERMÖGLICHKEITEN

1. Inkubation: Wenn man die Pipettenspitzen zwischen den einzelnen Pipettiergängen nicht wechselt, kann es zu falsch positiven oder negativen Testergebnissen kommen. Auch andere Pipettierfehler können die Testergebnisse verfälschen. Möglicherweise war auch die Temperatur des Wasserbades falsch eingestellt. Weitere Fehlermöglichkeiten liegen in der unkorrekten Durchführung des Wasch-Absaug-Vorgangs, im ungenügenden Andrücken der Deckfolie und in deren unvorsichtiger Lösung (Übertritt von Serum bzw. Plasma).

2. Inkubation: Hier kann es zu falschen Testergebnissen kommen, wenn man die Multipipette falsch einstellt oder sonstige Pipettierfehler begeht. Auch die unkorrekte Einstellung des Wasserbades kann die Resultate des Enzymimmunoassays verfälschen, ebenso wie die unkorrekte Durchführung des Wasch-Absaug-Vorgangs und die unkorrekte Herstellung des lyophilisierten Konjugats.

3. Inkubation: Hier kommt es zur Verfälschung des Testresultats, wenn man die Flüssigkeitsschalen verwechselt oder aber mit Peroxidhaltigen Flüssigkeiten bzw. Substanzen kontaminiert. Die unkorrekte Herstellung der Harnstoff-Peroxid-Lösung (Verfallsdatum!) und der OPD-Lösung (nicht im Dunkeln aufbewahrt, länger als eine Stunde nach Herstellung gewartet bis zum Verbrauch) führt zu falschen Testergebnissen. Findet die Farbreaktion nicht im Dunkeln statt oder wird der Beendigungszeitpunkt der Farbreaktion nicht korrekt eingehalten (evtl. Reihenfolge geändert), werden die Resultate ebenfalls verfälscht.

Photometer: Fehlermöglichkeiten während dieses Arbeitsschrittes liegen in der unkorrekten Einstellung des Photometers, in der Verwendung eines falschen Filters, in der ungenügenden Füllung der Küvetten (Bläschen) und in der Verunreinigung von Küvetten.

Ein Brutschrank anstelle eines Wasserbades ist bei gleichen Zeiten für die einzelnen Inkubationen nicht geeignet.

ERGEBNISSE

DIE ABHÄNGIGKEIT DER EXTINKTIONEN VON DER KONZENTRATION DER SCHWEFELSÄURE

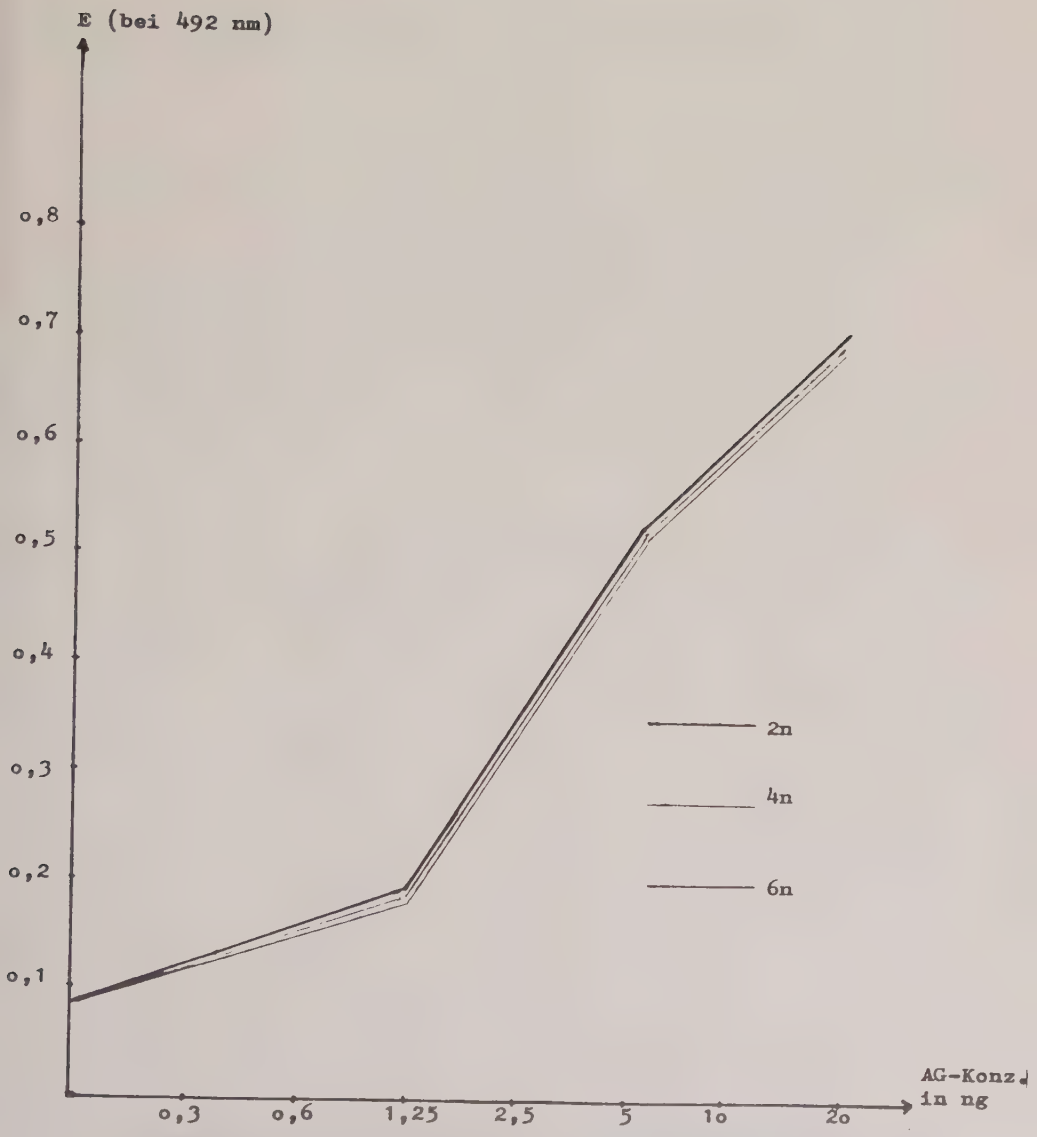
Wie bereits unter MATERIALIEN UND METHODEN beschrieben waren die in den Originalvorschriften zum Hepanostika-Microelisa-System angegebene Substrat- und Schwefelsäuremenge für die o,3 ml-Küvette des Photometers nicht ausreichend. Um eine genügend große Messmenge für die Küvette zu erhalten, empfahl es sich, die Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration der Schwefelsäure zu untersuchen. Abbildung I zeigt die Ergebnisse einer Verdünnungsreihe. Erste und zweite Inkubation fanden jeweils zwei Stunden bei 37°C statt, die dritte Inkubation fünfzig Minuten bei Zimmertemperatur. In der dritten Inkubation wurden o,15 ml Substrat (Herstellung mit 17 ml statt 15 ml destilliertem Wasser für die OPD-Lösung) in die Vertiefungen der Microtiterplatten gegeben. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von o,15 ml 2n, 4n und 6n Schwefelsäure beendigt. Tabelle I zeigt die Extinktionen der negativen Kontrollen.

Tab. I

Konz. der H_2SO_4	Extinktion der negativen Kontrolle			
	Probe I	II	III	$\bar{x}$
2 n	o,o87	o,o9o	o,o9o	o,o89
4 n	o,o9o	o,o9o	o,o91	o,o9o
6 n	o,o87	o,o91	o,o89	o,o89

Der Einfluß der Schwefelsäure auf die Höhe der Extinktionen ist gering; bei Verwendung von 2 n Schwefelsäure werden keine schlechteren Resültate erreicht als bei Verwendung von 4 n und 6 n Schwefelsäure.

Abb.I



Die Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration der H_2SO_4: Bei Verwendung von 2n H_2SO_4 werden keine schlechteren Resultate erreicht als bei Verwendung von 4n und 6n H_2SO_4.

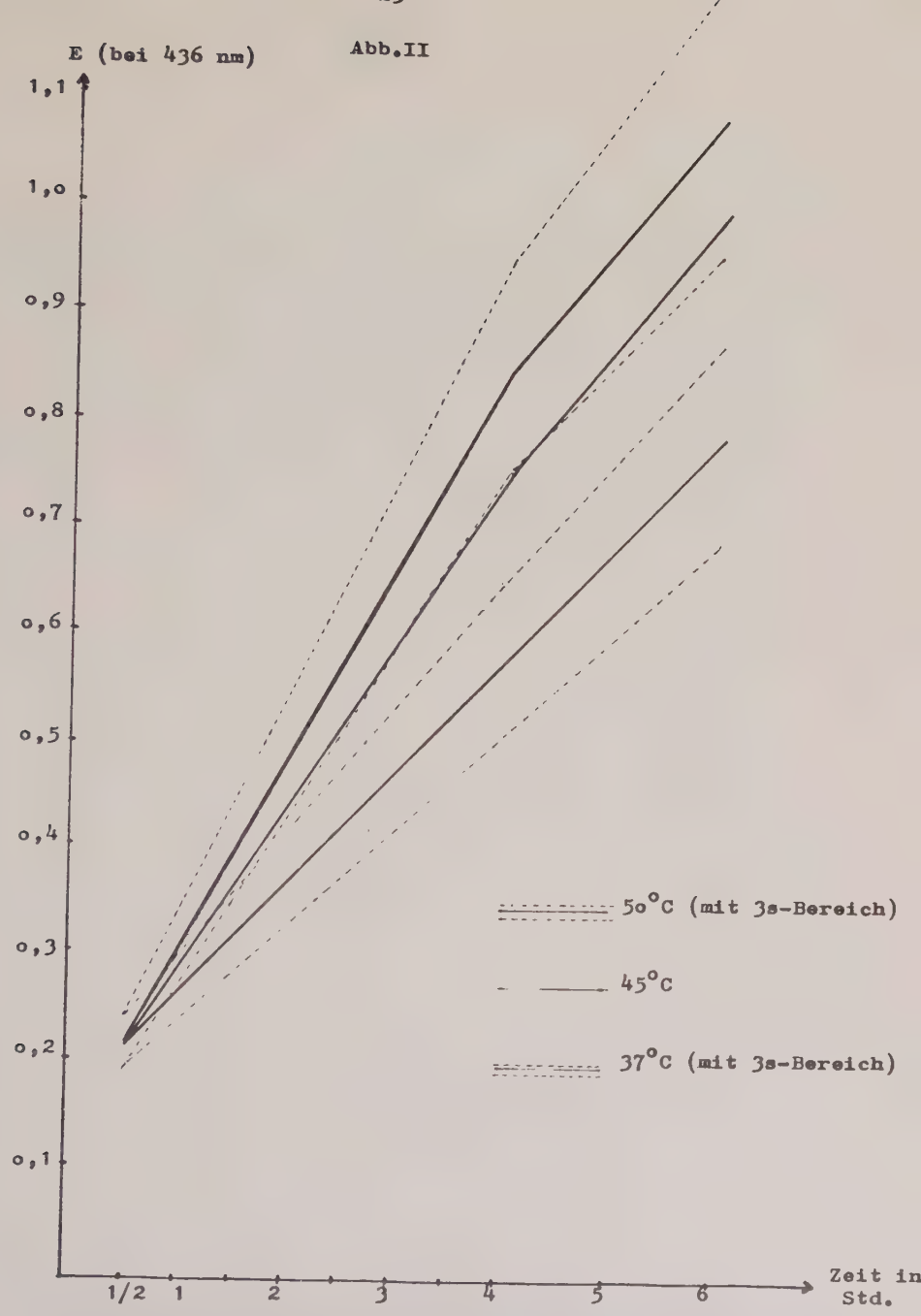
DIE ZEITABHÄNGIGKEIT DER VERSCHIEDENEN INKUBATIONEN

Es wurde die Zeitabhängigkeit der ersten Inkubation bei 37, 45 und 5o°C untersucht. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden lagen die Extinktionen bei 5o°C am höchsten, während 37°C die niedrigsten Extinktionen der drei Vergleichstemperaturen zeigte, wie auch in Abbildung II dargestellt. Die zweite Inkubation fand zwei Stunden bei 37°C statt, die dritte Inkubation wie oben beschrieben. Tabelle II gibt die Extinktionen der negativen Kontrollen wieder. Die Antigenkonzentration der positiven Proben betrug 2o ng.

Tab. II

Zeit in Stunden	Extinktionen bei 37°C	45°C	5o°C
1/2 Std.	o,o91	o,o9o	o,o9o
1 "	o,o91	o,o91	o,o92
1 1/2 "	o,o91	o,o92	o,o92
2 "	o,o92	o,o92	o,o93
2 1/2 "	o,o92	o,o93	o,o93
3 "	o,o94	o,o93	o,o94
3 1/2 "	o,o94	o,o94	o,o93
4 "	o,o95	o,o94	o,o94
5 "	o,o95	o,o95	o,o95
6 "	o,o95	o,o95	o,o96

Bei allen drei Vergleichstemperaturen betrug die Standardabweichung der Extinktionen o,oo4.



Die Zeitabhängigkeit der ersten Inkubation: Die Extinktionen steigen bei allen drei Inkubationstemp. mit längeren Inkubationszeiten. Bei 5o°C werden deutlich bessere Resultate erreicht als bei 37°C.

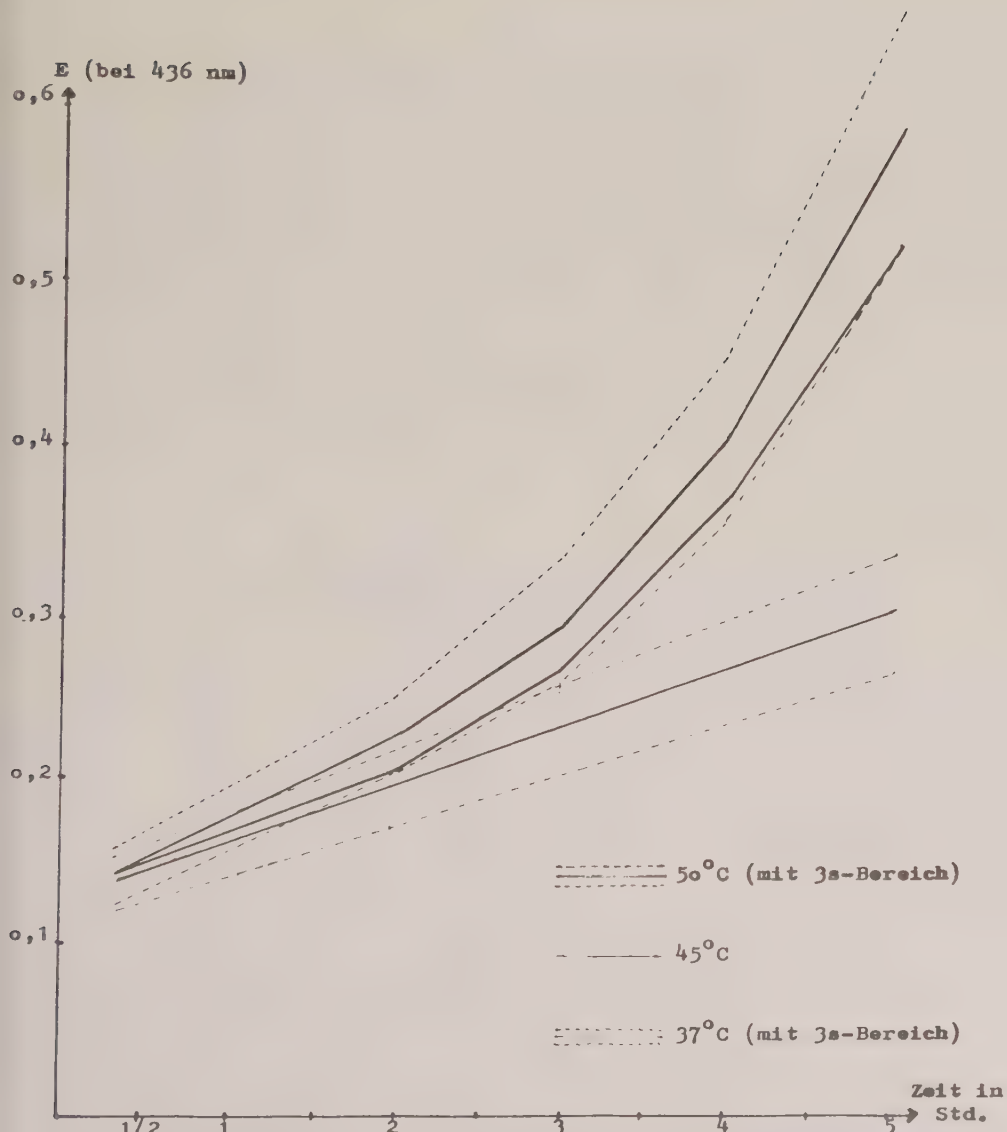
Es folgte die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der zweiten Inkubation bei 37, 45 und 5o°C. Die erste Inkubation fand zwei Stunden bei 37°C statt, die dritte Inkubation wieder wie oben beschrieben. Auch hier betrug die Antigenkonzentration der positiven Proben 2o ng. Wiederum lagen die Extinktionen nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden bei 5o°C am höchsten; 37°C zeigte einmal mehr die niedrigsten Extinktionen der drei Vergleichstemperaturen. Abbildung III gibt die Ergebnisse der positiven Proben wieder. Tabelle III zeigt die Extinktionen der negativen Kontrollen.

Tab. III

Zeit in Stunden	Extinktionen bei 37°C	45°C	5o°C
1/2 Std.	o,o9o	o,o91	o,o94
1 "	o,o89	o,o9o	o,o93
1 1/2 "	o,o9o	o,o92	o,o94
2 "	o,o92	o,o93	o,o95
2 1/2 "	o,o91	o,o93	o,o93
3 "	o,o9o	o,o94	o,o96
3 1/2 "	o,o89	o,o93	o,o98
4 "	o,o92	o,o93	o,o95
4 1/2 "	o,o89	o,o95	o,o95
5 "	o,o93	o,o93	o,o95

Bei allen drei Vergleichstemperaturen betrug die Standardabweichung der Extinktionen o,oo4.

Abb.III



Die Zeitabhängigkeit der zweiten Inkubation: Die Extinktionen steigen bei allen drei Temperaturen mit längeren Inkubationszeiten. Bei 50°C werden deutlich bessere Resultate erreicht als bei 37°C.

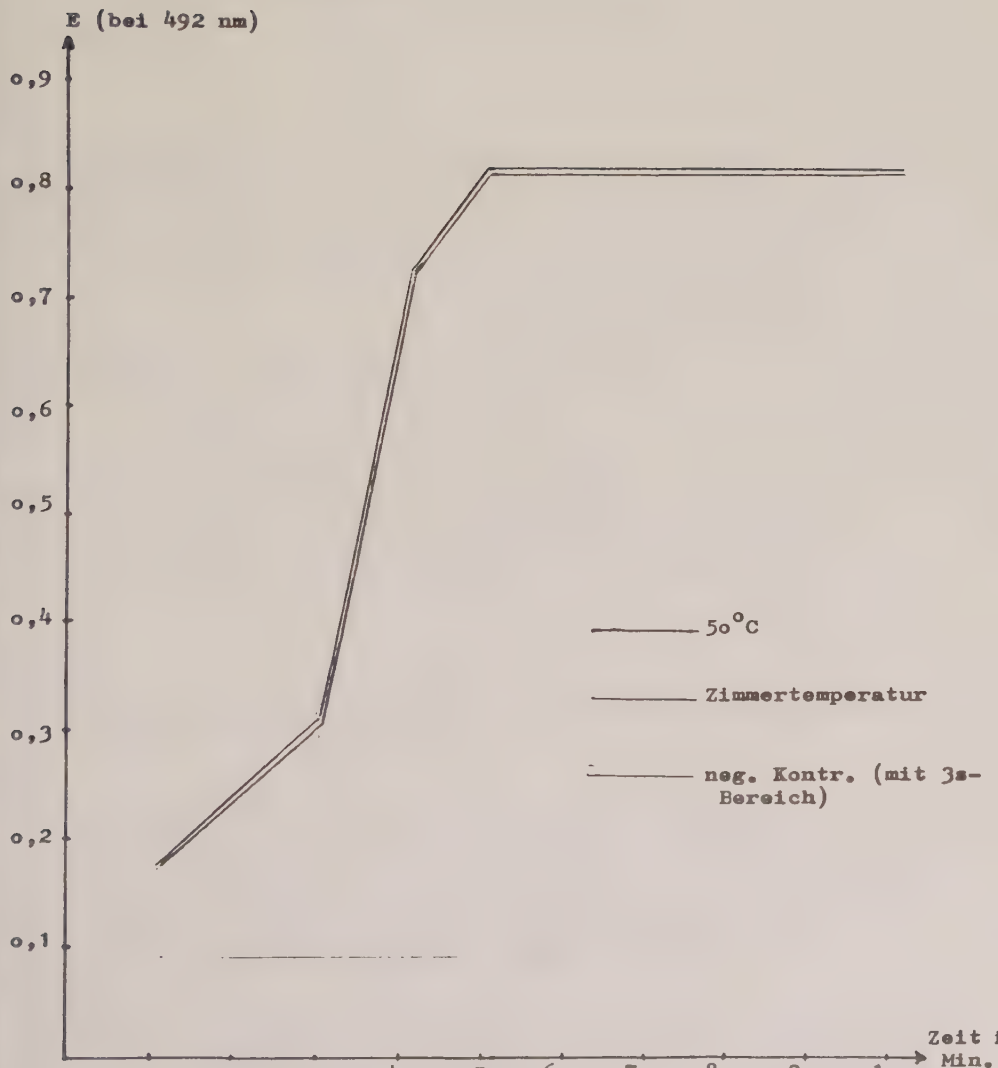
Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der dritten Inkubation führte zu folgenden Ergebnissen: Nach einer Zeit von fünfzig Minuten für die Farbreaktion läßt sich die Extinktion der positiven Proben kaum noch steigern (siehe Abbildung IV). Der günstigste Zeitpunkt zur Beendigung der Farbreaktion liegt demnach - wie von Organon angegeben - bei fünfzig Minuten Durch Temperaturerhöhung auf 5o°C ließ sich hier weder die Reaktion beschleunigen, noch die Extinktion der positiven Proben erhöhen. Die Extinktionen der negativen Kontrollen sind in Tabelle IV wiedergegeben Bei diesem Versuch lief die erste Inkubation zwei Stunden bei 37°C, die zweite Inkubation ebenfalls. Die Antigenkonzentration der positiven Proben betrug wiederum 2o ng.

Tab. IV

Zeit in Minuten	Extinktionen bei Zimmertemperatur	5o°C
1o Min.	o,o88	o,o86
2o "	o,o89	o,o86
3o "	o,o89	o,o89
4o "	o,o87	o,o87
5o "	o,o9o	o,o89
6o "	o,o9o	o,o85
7o "	o,o93	o,o89
8o "	o,o9o	o,o9o
9o "	o,o89	o,o9o
1oo "	o,o88	o,o91

Bei Zimmertemperatur und bei 5o°C betrug die Standardabweichung der Extinktionen o,oo4.

Abb.IV



Die Zeitabhängigkeit der dritten Inkubation: Bis zur fünfzigsten Minute steigen die Extinktionen bei Zimmertemperatur und 50°C deutlich, nachher kaum noch. Die Temperaturerhöhung auf 50°C führt hier nicht zu besseren Resultaten.

DIE TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER VERSCHIEDENEN INKUBATIONEN

Abbildung V zeigt die Temperaturabhängigkeit der ersten Inkubation bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden. Hier fand die zweite Inkubation zwei Stunden bei 37°C statt, die dritte wie oben beschrieben. Tabelle V gibt Mittelwerte und Standardabweichung der negativen Kontrollen wieder.

Tab. V

E	S (bei 37°C)	E	S (bei 45°C)	E	S (bei 50°C)
0,089	0,004	0,092	0,004	0,093	0,004

Abbildung VI zeigt die Temperaturabhängigkeit der zweiten Inkubation bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden. Hier fand die erste Inkubation zwei Stunden bei 37°C statt, die dritte wie oben beschrieben. Tabelle VI gibt Mittelwerte und Standardabweichung der negativen Kontrollen wieder.

Tab. VI

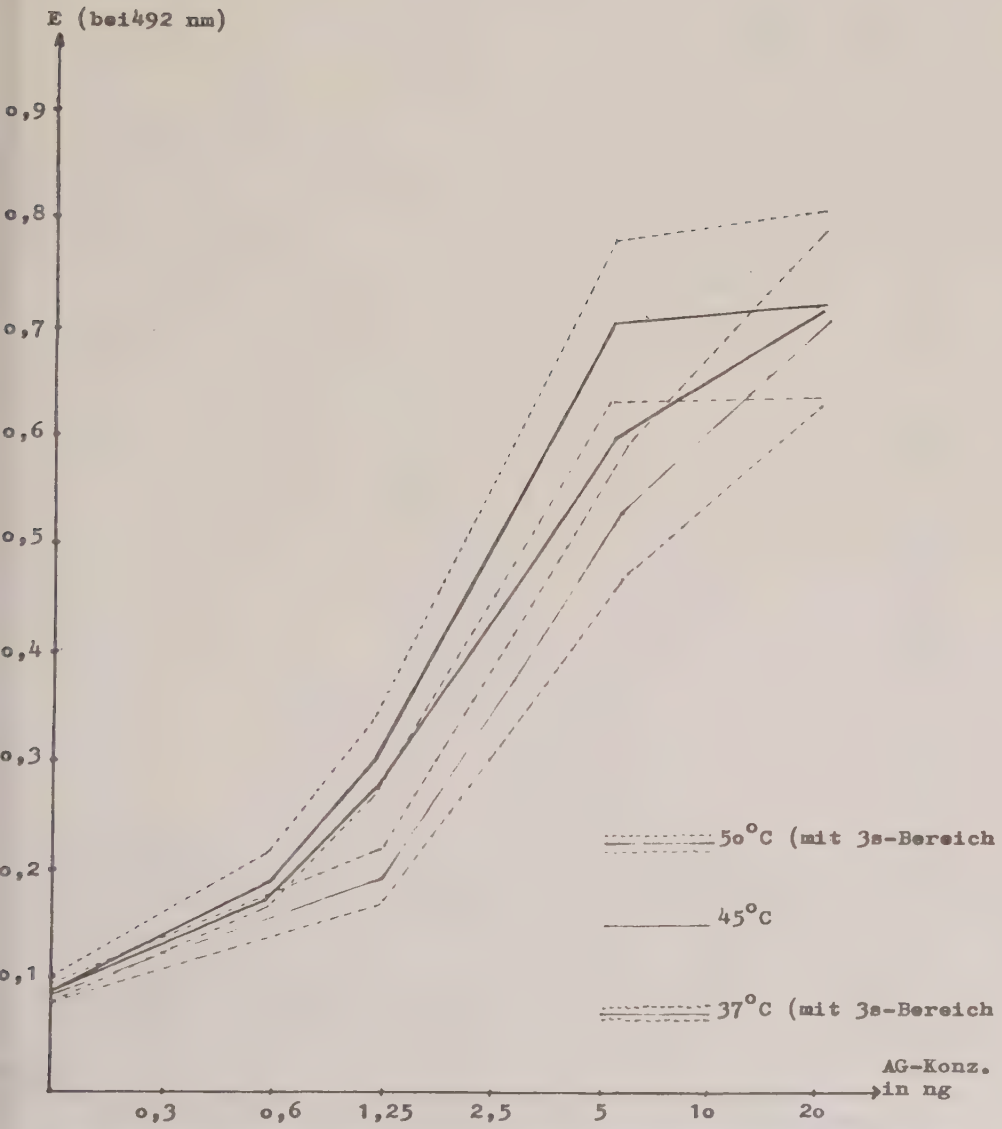
E	S (bei 37°C)	E	S (bei 45°C)	E	S (vei 50°C)
0,089	0,004	0,090	0,004	0,092	0,004

Nun erhöhten wir die Temperatur bei erster und zweiter Inkubation parallel. Die Inkubationsdauer für sie betrug jeweils zwei Stunden. Die dritte Inkubation fand wieder wie oben beschrieben statt. Abbildung VII zeigt die Extinktionen der positiven Proben; Tabelle VII gibt Mittelwerte und Standardabweichung der negativen Kontrollen wieder.

Tab. VII

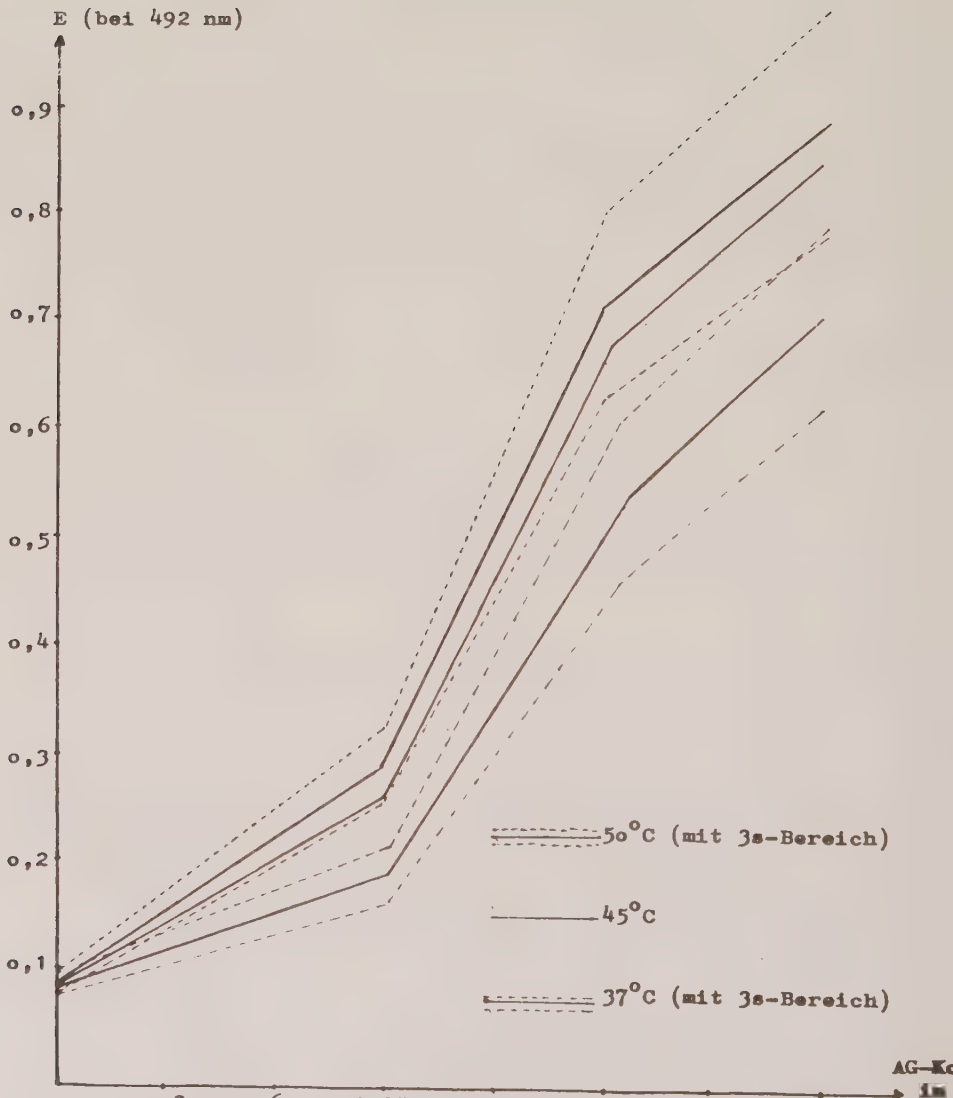
E	S (bei 37°C)	E	S (bei 45°C)	E	S (bei 50°C)
0,089	0,004	0,092	0,004	0,096	0,004

Abb.V



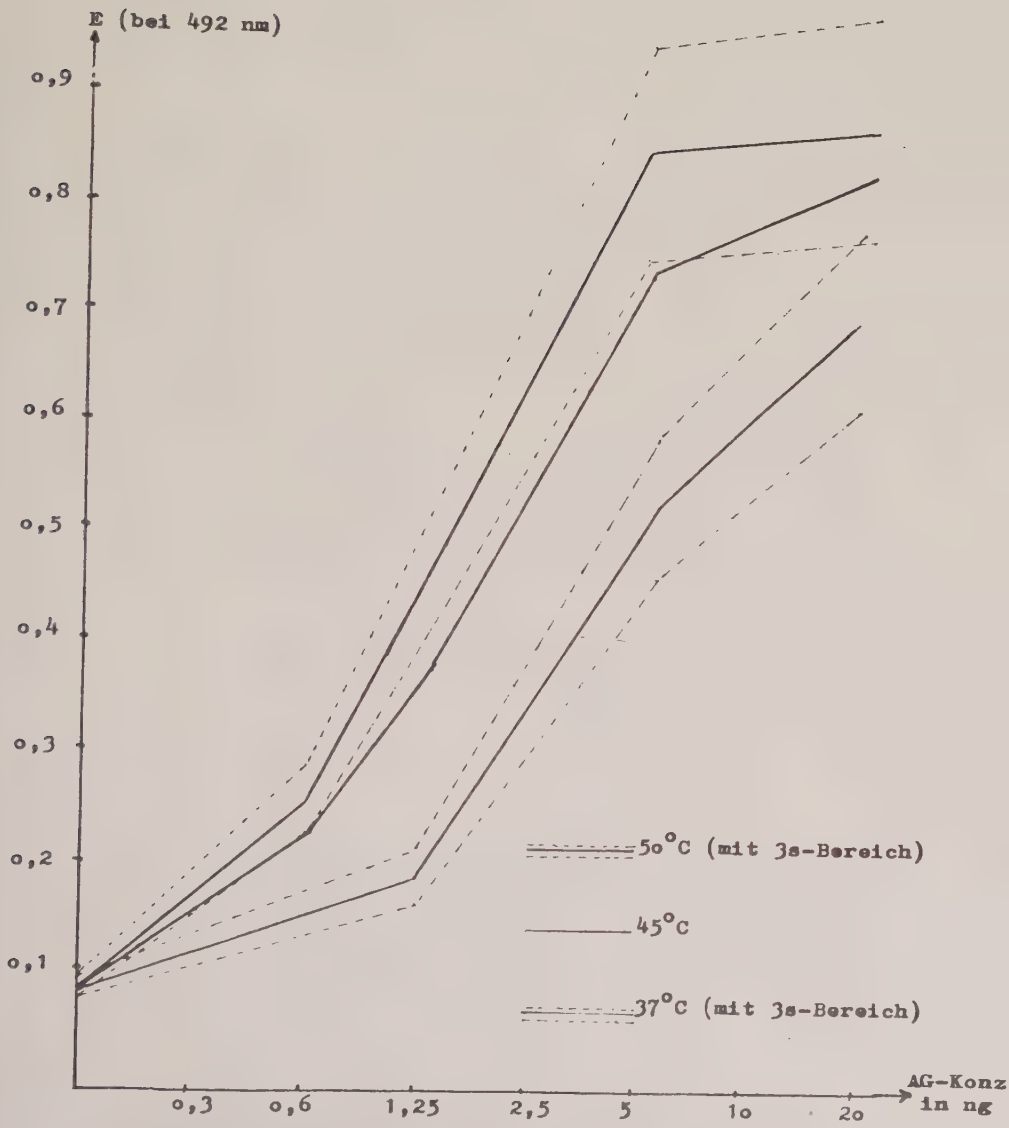
Die Temperaturabhängigkeit der ersten Inkubation: Besonders im Bereich o,6 ng bis 5 ng Antigenkonzentration werden bei 50°C bessere Resultate erreicht als bei 37°C.

Abb.VI



Die Temperaturabhängigkeit der zweiten Inkubation: Bei einer Inkubationstemperatur von 5o°C werden bessere Resultate erreicht als bei 37°C.

Abb.VII



Die Temperaturabhängigkeit von erster und zweiter Inkubation: Bei einer Inkubationstemperatur von 5o°C werden deutlich bessere Resultate erreicht als bei 37°C.

Der Hersteller empfiehlt eine maximale Inkubationstemperatur von 37°C. Erhöhen wir jedoch die Temperatur in erster und zweiter Inkubation auf 50°C, so lassen sich die Extinktionen insbesondere der niedrigen Antigenkonzentrationen deutlich steigern.

VERSUCH DER ZEITLICHEN VERKÜRZUNG DER METHODE

Aus den bisherigen Tests läßt sich analog dem RIA (14) folgende Arbeitshypothese aufstellen: Die Empfindlichkeit der Methode läßt sich durch Temperaturerhöhung auf 5o°C bei erster und zweiter Inkubation deutlich steigern, d.h. der Zeitbedarf sinkt bei gleicher Empfindlichkeit. Hier stellt sich nun die Frage, wie weit sich erste und zweite Inkubation zeitlich verkürzen lassen, ohne dabei gegenüber der Originalmethode einen Empfindlichkeitsverlust zu zeigen.

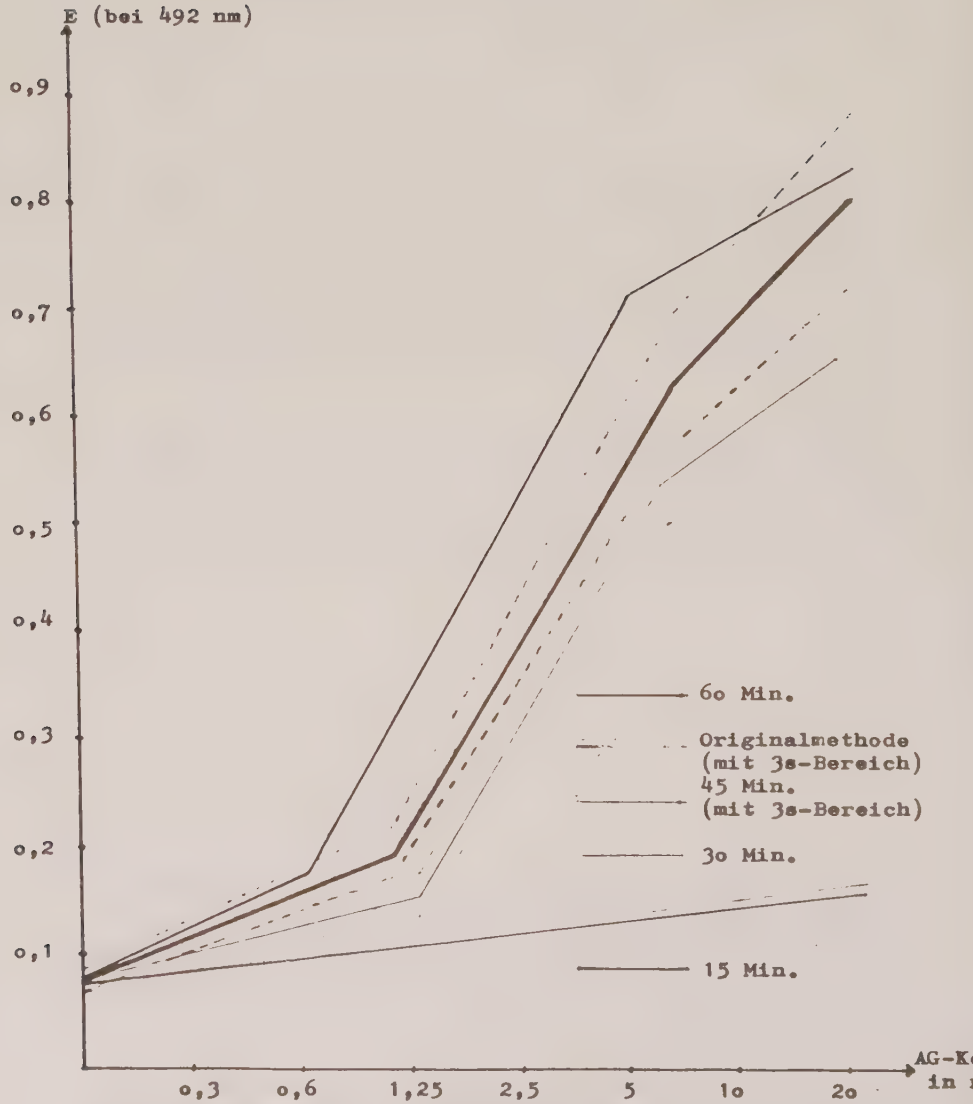
Erste und zweite Inkubation wurden bei einer Inkubationstemperatur von 5o°C auf jeweils 6o, 45, 3o und 15 Minuten verkürzt. Abbildung VIII zeigt die Extinktionen der positiven Tests. Die dritte Inkubation fand wieder wie oben beschrieben statt. Tabelle VIII zeigt die Mittelwerte der negativen Kontrollen bei einer Standardabweichung von jeweils o,oo4.

Tab. VIII

Zeit in Minuten	Extinktionen
6o	o,o93
45	o,o93
3o	o,o84
15	o,o84

Der Hersteller empfiehlt eine Inkubationszeit von zwei Stunden. Die Extinktionen, die nach dieser Zeit bei 37°C erreicht werden, werden durch Temperaturerhöhung auf 5o°C bereits nach einer Stunde erreicht. Eine Verkürzung darunter führte zu einer Empfindlichkeitseinbuße gegenüber der Originalmethode.

Abb.VIII

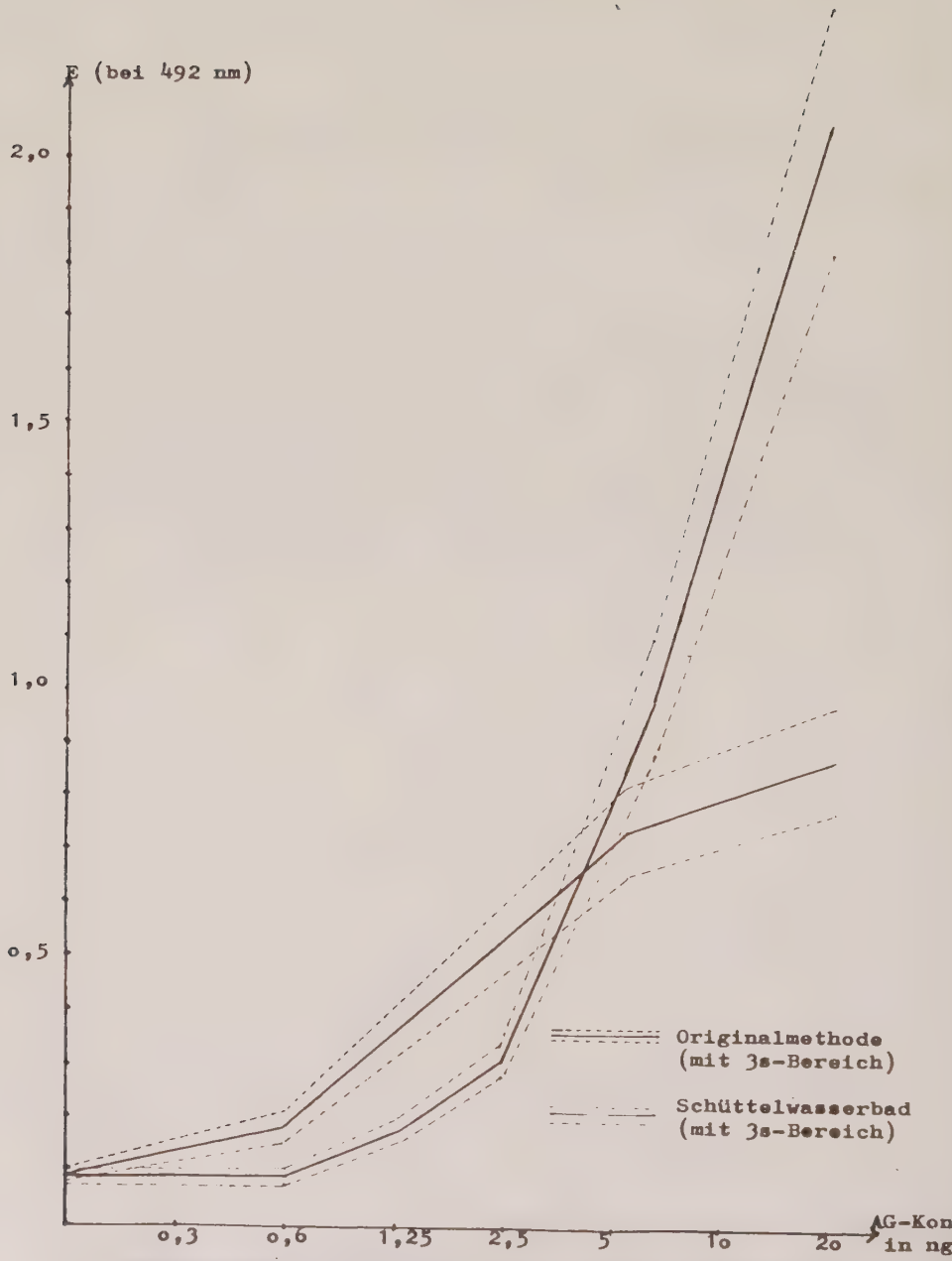


Versuch der zeitlichen Verkürzung der Methode: Eine zeitliche Verkürzung unter jeweils 6o Minuten in erster und zweiter Inkubation führt im Bereich o,6 ng bis 5 ng Antigenkonzentration zu einer Empfindlichkeitseinbuße gegenüber der Originalmethode.

DIE ABHÄNGIGKEIT DER EXTINKTIONEN VOM INKUBATIONSMODUS

Es stand noch die Frage offen, ob sich durch Änderung des Inkubationsmodus eine weitere Verkürzungsmöglichkeit der Methode ergab. Hierzu untersuchten wir erste und zweite Inkubation je eine Stunde im Schüttelwasserbad bei 5o°C. Die dritte Inkubation fand wieder wie oben beschrieben statt. Abbildung IX zeigt die Extinktionen der positiven Proben (Verdünnungsreihe). Die Extinktionen der negativen Proben hatten einen Mittelwert von o,o82 und eine Standardabweichung von o,oo3.

Abb. IX



Die Abhängigkeit der Extinktionen vom Inkubationsmodus: Durch Schütteln lassen sich die Extinktionen oberhalb 5 ng Antigenkonzentration erhöhen. Bei einer Antigenkonzentration von 2,5 ng und weniger kommt es jedoch durch Schütteln zu einer Empfindlichkeitseinbuße gegenüber der Originalmethode.

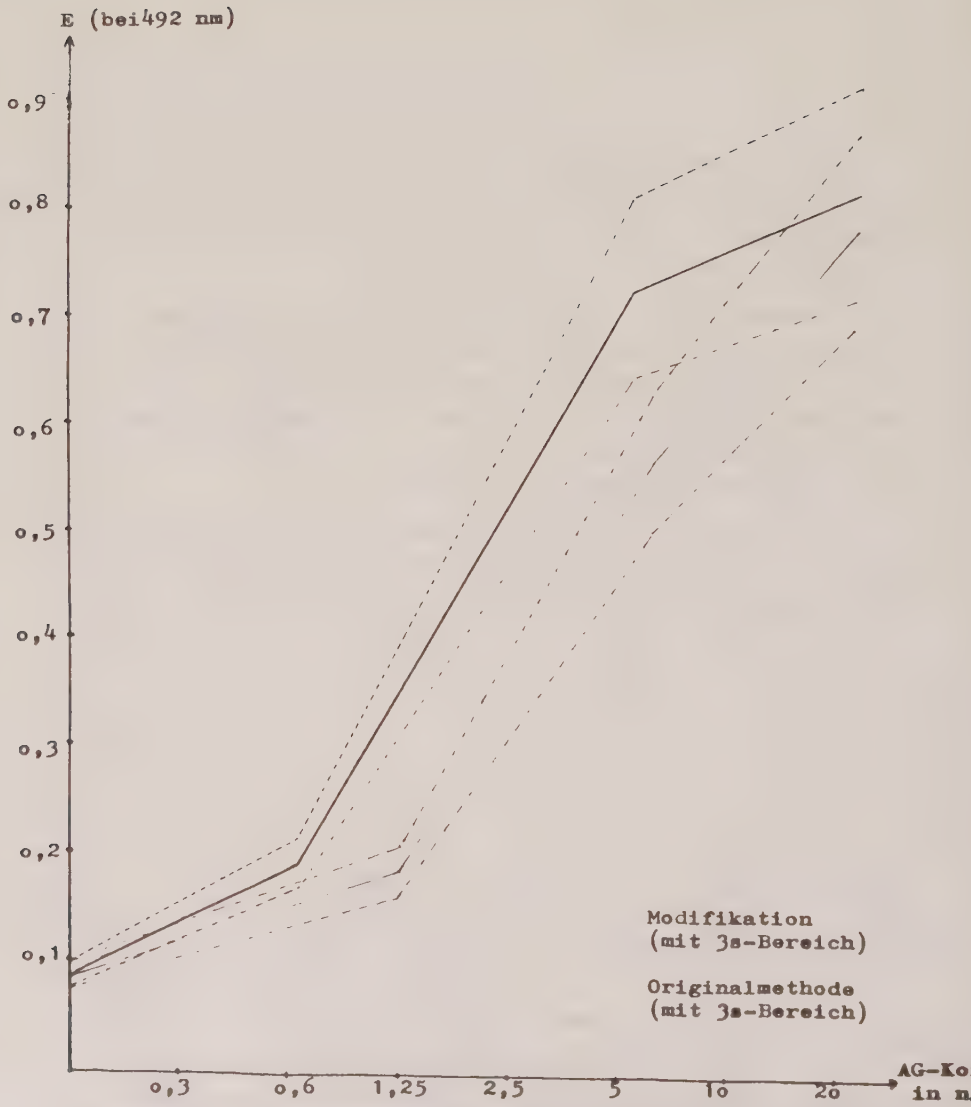
VERGLEICH VON ORIGINALMETHODE UND MODIFIKATION

Folgende Zeiten und Temperaturen sind für die zeitliche Modifikation zu nennen: Erste Inkubation eine Stunde bei 5o°C, zweite Inkubation eine Stunde bei 5o°C und dritte Inkubation fünfzig Minuten bei Zimmertemperatur.

Abbildung X zeigt im Vergleich die positiven Testergebnisse von Originalmethode und Modifikation. Die Eichkurve der Modifikation zeigt im Bereich der Antigenkonzentration von o,6 ng bis lo ng sogar höhere Extinktionen als die Eichkurve der Originalmethode. Hieraus geht hervor, daß die Modifikation gegenüber der Originalmethode sogar eine größere Empfindlichkeit aufweist.

Der Mittelwert der negativen Kontrollen lag in der Originalmethode bei o,o89 und in der Modifikation bei o,o93. Die Standardabweichung der negativen Kontrollen betrug bei beiden Methoden o,oo4.

Abb.X



Vergleich von Originalmethode und Modifikation: Im Bereich oberhalb o,6 ng und unterhalb 1o ng Antigenkonzentration zeigt die Modifikation höhere Extinktionen als die Originalmethode.

EINFLUSS VON HEPARIN UND VERGLEICH MIT DEM RIA

Wegen des hohen Zeitaufwandes bei der Trennung des Blutkuchens vom Serum in den Röhrchen überprüften wir die Verwendungsmöglichkeit von Heparinplasma. Dabei ergab sich gleichzeitig die Möglichkeit, Ergebnisse von EIA und RIA miteinander zu vergleichen. Hierzu wurden 1ooo im RIA negative und 1oo im RIA positive Heparinplasmen in der Modifikation des EIA untersucht. Die negativen Heparinplasmen hatten einen Mittelwert der Extinktionen von o,o76 bei einer Standardabweichung von o,oo3. Alle im RIA positiven Proben waren auch im modifizierten EIA positiv; alle im RIA negativen Proben waren auch im modifizierten EIA negativ. Tabelle IX zeigt die Extinktionen der positiven Proben.

Tab. IX

2,2oo	2,2oo	2,25o	2,2oo	1,9oo	2,1oo	2,3oo	2,1oo	o,98o	2,o5o
2,ooo	2,3oo	2,1oo	2,2oo	2,3oo	1,64o	1,95o	2,1oo	1,9oo	1,95o
2,1oo	2,1oo	2,2oo	1,o2o	o,93o	2,ooo	1,9oo	1,95o	2,o5o	1,9oo
2,1oo	2,2oo	2,15o	2,25o	2,15o	2,1oo	1,45o	1,28o	1,68o	2,o5o
1,85o	1,8oo	1,95o	2,1oo	2,1oo	1,53o	2,2oo	2,25o	1,95o	2,15o
1,55o	1,95o	1,95o	1,95o	1,36o	1,95o	2,2oo	o,91o	1,9oo	2,2oo
o,9oo	o,93o	2,1oo	2,15o	1,34o	1,8oo	1,85o	1,95o	1,o9o	1,9oo
1,14o	1,78o	2,ooo	2,ooo	2,15o	1,9oo	1,95o	2,3oo	2,25o	1,o2o
2,2oo	2,1oo	2,o5o	2,25o	2,15o	1,4oo	2,2oo	1,45o	2,3oo	2,15o
1,46o	1,44o	2,ooo	2,1oo	2,15o	2,15o	1,9oo	1,42o	1,ooo	1,95o

Alle 1oo positiven Proben hatten Extinktionen, die weitaus grösser waren als das 2,1fache des Mittelwertes der negativen Proben. Keine Probe hatte eine Extinktion, die kleiner war als die der positiven Kontrollen mit 2o ng Antigenkonzentration.

Das Verhältnis der Counts im RIA von positiver Kontrolle (2o ng) zu negativer Kontrolle war etwa 15oo/1oo = 15.

Das Verhältnis der Extinktionen im EIA von positiver Kontrolle (2o ng) zu negativer Kontrolle war etwa 8oo/8o = 1o.

Bei hohen Konzentrationen des Antigens verläuft die Eichkurve des RIA zwar steiler; dennoch weist der RIA keine bessere Empfindlichkeit auf als der EIA, denn seine Nachweisgrenze liegt nicht niedriger als die des EIA.

DISKUSSION

Ebenso wie mit radioimmunologischen Methoden ist es heute mit enzymologischen Methoden möglich, sehr niedrige Konzentrationen an HBsAG im Blut zu bestimmen. Die vom Hersteller angegebene statistische Auswertung der photometrisch gemessenen Extinktionen (analog zum RIA das 2,1fache der unspezifischen Bindung) muß jedoch kritisiert werden. Der Faktor 2,1 beruht auf der Überlegung, daß man als Grenze der Streuung der negativen Werte (G) bei einem vorausgesetzten Variationskoeffizienten (VK) von 15% analog zum RIA die siebenfache Standardabweichung (s) nimmt. Dies geht aus folgender Berechnung hervor:

$$G = \bar{x} + 7s \qquad G = \frac{7 \cdot VK \cdot \bar{x}}{100} \qquad G = 2{,}05\ \bar{x}$$

Aufgerundet ist G dann 2,1 $\bar{x}$. $\bar{x}$ bedeutet dabei den Mittelwert der negativen Proben.

Einerseits kann dieser Faktor 2,1 ohnehin nur dann zulässig sein, wenn die Standardstreuung der negativen Werte im EIA derjenigen im RIA entspräche; andererseits ist auch die siebenfache Standardstreuung als Grenze der negativen Werte sehr weit gegriffen. Gemessene Extinktionserhöhungen können so fälschlicherweise als durch die Streuung verursacht interpretiert werden.

Die Ergebnisse der verschiedenen Autoren zur Streuung der negativen Werte im EIA waren recht unterschiedlich, insbesondere die Angaben über unspezifisch positive Reaktionen. In den Untersuchungen von SEIDL, KÜHNER, TRAUTMANN und PADE (56) war das Verhältnis von unspezifisch positiven Reaktionen in EIA und RIA wie 3:2. In der Vergleichsuntersuchung von LANGE, KÖHLER, APODACA, OTT und SUCKER (57) zeigte der Hepanostika-Test in 1,6 - 3,8% und der Ausria II in 0,5 - 0,8% unspezifisch positive Reaktionen. In GERLICH, STAMM und THOMSONs Untersuchungen (58) reagierten von 5148 Seren 74 unspezifisch positiv. GERLICH führte

dies, ebenso wie die Streuung der negativen Werte, die in seinen Untersuchungen um den Faktor 2 größer waren als im RIA, auf die im EIA fehleranfälligere Waschprozedur zurück, die folglich hier mit größerer Sorgfalt durchgeführt werden muß, um falsch positive Werte zu vermeiden (siehe FEHLERMÖGLICHKEITEN).

Die oben angeführten Ergebnisse konnten wir in unseren Untersuchungen zum EIA nicht bestätigen. 1000 negative Heparinplasmen wiesen einen Mittelwert von 0,076, eine Standardabweichung von 0,003 und einen Variationskoeffizienten von 4% auf. Schon durch diese Werte ist die oben angegebene Grenze (G) der negativen Werte viel zu weit bemessen.

Da in der bisherigen Praxis bereits der Bereich $\bar{x} + 3s$ ungefähr 99% der negativen Werte abdeckt, reicht dieser Bereich als Grenze der Streuung der negativen Werte vollkommen aus. Hierdurch wird sowohl in der Originalmethode als auch in der Modifikation die Nachweisgrenze von 1,25 ng auf 0,3 ng Antigenkonzentration gesenkt. Ermittelt man nun in jeder Serie Mittelwert und Standardabweichung neu, dann kann man einerseits auf die ohnehin problematische Verwendung der mitgelieferten negativen Kontrollen verzichten und andererseits diese Ermittlung im Sinne einer Qualitätskontrolle verwenden. Im Reaktionsausfall zweifelhafte Ergebnisse sollten bei verlängerten Inkubationszeiten nachuntersucht werden. Auf diese Weise sind sie eindeutig zu klassifizieren.

Die Verwendung von Heparinplasmen ist mit einem Zeitgewinn verbunden. In diesem Fall können jedoch die mitgelieferten negativen Kontrollproben nicht angewandt werden, da sie durch ihre andere Zusammensetzung nicht repräsentativ sind. Dies ist aber durch die jeweilige Neuermittlung von Mittelwert und Standardabweichung der negativen Heparinplasmen ohnehin nicht notwendig.

Als Resultat der Zeitverkürzung durch die Modifikation können dem Kliniker das Blut und seine Bestandteile um zwei Stunden früher zur Verfügung gestellt werden. Da in der Modifikation gegenüber der Originalmethode sogar eine leicht erhöhte Empfindlichkeit aufweist, scheint es auf jeden Fall ausreichend, die Untersuchungen auf HBsAG in der modifizierten Methode mit einem Zeitaufwand von 2 x 60 + 50 Minuten durchzuführen, um das Hepatitis B-Risiko zu vermeiden.

ZUSAMMENFASSUNG

Als Alternative zum Radioimmunoassay bietet sich der Enzymimmuntest Hepanostika an, der durch Verwendung nicht-radioaktiven Materials eine längere Haltbarkeit verspricht und die in der Strahlenschutzverordnung festgelegten Auflagen umgeht. Wegen des hohen Zeitaufwandes für diese Untersuchung wurde die Möglichkeit geprüft, den Arbeitsgang zu verkürzen. Hierbei kam es zu folgenden Ergebnissen:

1. Durch die Verwendung von Heparinplasmen anstelle von Serum läßt sich die für die Gerinnung und die manuelle Lösung der Gerinnsel vom Röhrchenrand notwendige Zeit einsparen.

2. Durch Erhöhung der Temperatur während der einzelnen Inkubationen läßt sich die Methode bei gleich guter Empfindlichkeit deutlich verkürzen und bei gleichem Zeitaufwand empfindlicher gestalten.

3. Im Reaktionsausfall zweifelhafte Ergebnisse können durch eine Nachuntersuchung bei verlängerten Inkubationszeiten eindeutig klassifiziert werden.

4. Auf die mitgelieferten negativen Kontrollen kann verzichtet werden, wenn Mittelwert und Streuung in jeder Serie neu ermittelt werden. Durch große Sorgfalt beim Ausführen der einzelnen Arbeitsschritte läßt sich der Variationskoeffizient der negativen Proben deutlich senken. Es reicht aus, als Grenzwert der negativen Proben den Mittelwert plus der dreifachen Standardabweichung zu nehmen. So wird die Nachweisgrenze erheblich verbessert (auf o,3 ng Antigen/ml).

5. Als Resultat der Zeitverkürzung durch die Modifikation können dem Kliniker das Blut und seine Bestandteile um zwei Stunden schneller zur Verfügung gestellt werden. Das Hepatitis B-Risiko wird durch diese zeitliche Verbesserung nicht erhöht.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) BEGEMANN, H.: Klinische Hämatologie
Thieme (1975)

(2) SPIELMANN, W.: Transfusionskunde
Thieme (1967)

(3) MATTHES, M., ORTH, G.W.: Leitfaden der Bluttransfusion
Fischer (1955)

(4) Das Bluttransfusionswesen
Sammlung von Gesetzen und Richtlinien mit Kommentaren
Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Bluttransfusion
F.K. Schattauer Verl. Stuttgart - New York

(5) MOLLISON, P.L.: Bloodtransfusion in Clinical Medicine
Blackwell Scientific Publication (1972)

(6) GOETZ, O., PELLER, P., WEICH, B.: Antikörper gegen das Epstein-Barr Virus nach Bluttransfusionen
Dtsch. Med. Wschr. 99:448 (1974)

(7) Protokoll zum Essener Kongress "Hepatitis"

(8) COCKAYNE, E.A.: Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver

(9) ZUCKERMAN, A.J.: Perspectives on Viral Hepatitis
Richard B. Capps Symposium
Rush-Presbyterian-St. Lukes Medical Bulletin: Vol. 15 No.2

(10) BAMBERGER: Krankheiten des chylopoetischen Systems
Virchows Handbuch der Pathologie und Therapie. 5

(11) VIRCHOW, R.: Über das Vorkommen und den Nachweis des Hepatogenen, insbesondere des Catarrhalischen Ikterus
Virchow Arch. Path. Anatom. 32:117 (1865)

(12) FRÖHLICH, C.: Über Ikterusepidemien
Dtsch. Arch. Klin. Med. 24394 (1879)

(13) EPPINGER, H.: Ikterus
Wien. Klin. Wschr. 21:480 (1908)

(14) CULLINAN, E.R.: History of the Second World War U.K. Medical Series, Medicine and Pathology
Ed.V.Z. Cope, London, HMSO. pp 230 (1952)

(15) FLINDT, N.: Bibl. Laeger 7:420 (1890)

(16) MC DONNALD, S.: Acute yellow atrophy
Edin. Med. J. 15:208 (1908)

(17) MC DONNALD, S.: Acute yellow atrophy in syphilis
Brit. Med. J. 1:76 (1918)

(18) STOKES, J. H., RUEDEMANN, R., LENNON, W.S.: Epidemic infectious jaundice and its relation to the therapy of syphilis
Arch. Int. Med. 26:521 (1920)

(19) BERGSTRAND, H.: Über die akute und chronische gelbe Leberatrphie
Thieme, Leipzig (1930)

(20) FINDLAY, G.M., DUNLOP, J.L., BROWN, H.C.: Observations on epidemic catarrhal jaundice
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 25:7 (1931)

(21) LURMAN: Eine Ikterusepidemie
Berlin. Klin. Wschr. 22:20 (1885)

(22) MURRAY, D.H.: Acriflavine, its use, by intravenous injection, in treatment
J. Army Med. Corps 54:19 (1930)

(23) FLAMM, A., MALMROS, H., PERSSON, E.: Eine nsocomiale Ikterusepidemie
Acta Med. Scand. Suppl. 16:544 (1926)

(24) HARTFALL, S.J., GARLAND, H.G., GOLDIE, W.: Gold treatment of arthritis; review of 900 cases
Lancet 2:784 (1937)

(25) MC CALLUM, F.O.: Jaundice in syphilitics
Brit. J. Vener. Dis. 19:63 (1943)

(26) VOEGT, H.: Zur Ätiologie der Hepatits epidemica
Münch. Med. Wschr. 89:76 (1942)

(27) CAMERON, J.D.S.: Infective hepatitis
Quart. J. Med. NS 12:139, (1943)

(28) MC CALLUM, F.O., MC FARIAN, A.M., MILES, J.A.R., POLLOCK, M.R., WILSON, C.: Infective hepatitis. Studies in East Anglia during the period 1943-47
Spec. Rep. Ser. Med. Res. Conn. No.273, London HMSO (1951)

(29) HAVENS, J.R.: The etiologie of infectious hepatitis
JAMA 134:653 (1947)

(30) MC CALLUM, F.O.: Homologous serum hepatitis
Lancet 2:691 (1947)

(31) WORLD HEALTH ORGANISATION: Tech. Rep. Ser. No. 512 (1973)

(32) BLUMBERG, B.S.: Polymorphismus of the serum proteins and the development of iso-precipitins in transfused patients
Bull N.Y. Acad. Med. 40:377-386 (1964)

(33) PRINCE, A.M.: An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash 60:814-821 (1968)

(34) KAPLAN, P.M., GREENMAN, R.L., GERIN, J.L., et al.: DNA-Polymerase associated with human hepatitis B antigen
J. Virol. 12:995-1005

(35) HOLLAND, P.V., ALTER, H.J.,PURCELL, R.H., WALSH, J.H. MORROW, A.G., SCHMIDT, P.J.: The infectivity of blood containing the Australia antigen
In: Australia antigen pp. 191-203
Ed. J.E. Prier and H. Friedmann (University Park Press, Baltimore, Med. 1973)

(36) ZUCKERMAN, A.J.: Hepatitis in non human primates
Can. Med. Assoc. J. 106:468

(37) Commettee on Viral Hepatitis of the National Research Council, National Academy od Sciences
Morb. and Mort. 23:29 (1974)

(38) ZUCKERMAN, A.J.: Electron microscopy and immune electron microscopy
Bull WHO 42:975 (1970)

(39) SOULIER, J.P.: New data on HB antigen. Plenary session lectures of the International Society of Blood Transfusion at Helsinki July 27 August 1975

(40) MAGNIUS, L.O., ESPMARK, J.A.:New specifities in Australia antigen-positive sera distinct from the Le Bouvier determinants
J. Immunol. 109:1017 (1972)

(41) MAGNIUS, L.O., LINDHOLM, A., LUNDIN, P., NYMARSON, S.: A new antigen-antibody-system
J. Amer. Med. Ass. 231:356 (1975)

(42) SCHREITER, I.L., EDWARDS, M., PROZNA, M.: e-Antigen in HBsAG-carrier mothers
New Engl.J.Med. 293:940 (1975)

(43) OKADA, K., KAMIYAMA, T., INOMATO, M., IMAI, M., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M.: e-antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants
New Engl. J. Med. 294:746 (1976)

(44) THAMER, G., GMELIN, K., KOMMERELL, B.: Das e-Antigen
Dtsch. Med. Wschr. 101:1573-1575 (1976)

(45) CATT and TREAGER: Solid phase technique in radioimmunoassay
Science 158:1570 (1967)

(46) STUTE, R.: Untersuchungen zur Bestimmung des HBsAG im Radioimmunoassay
Diss. der Med. Fak. der Universität Düsseldorf (1976)

(47) WOLTERS, G., KUIJPERS, L., KACAKI, J., SCHUURS, A.H.W.: Festphasen-Enzymimmunoassay zum Nachweis von Hepatitis B-surface Antigen
J. Clin. Path. 29:873-879 (1976)

(48) LING. C.M., OVERBY, L.R.: Prevalence of Hepatitis B Virus Antigen as revealed by direct radioimmunoassay with ^{125}J-antibody
J. Immunol. 109-834

(49) MAIMOWICH, J., SELA, M.: Protein-bacteriophage conjugates: application in detection of antibodies and antigens
Science 164:1279-1280 (1969)

(50) LEUTE, R.K., ULLMANN, E.F., GOLDSTEIN, A., UERZENBERG, L.A.: Spin immunoassay technique for determination of morphine
Nature 236:93-94

(51) AALBERSE, R.C.: Quantitative Fluorimmunoassay
Clin. Chim. Acta 48:109-111 (1973)

(52) VAN WEEMEN, B.K., SCHUURS, A.H.W.: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates
FEBS Letters 15:231-236 (1971)

(53) VAN WEEMEN, B.K., POSCH, A.M.C., VAN MELL, H., LAANDS,

J.A.M., WOLTERS, G., RUIJTERS. L.P.C., SCHUURS, A.H.W.: Enzymimmunoassay
Vortrag (1975)

(54) AVRAMEAS, S.: Enzyme markers: Their linkage with proteins and use in immunohistochemistry
Histochem. J. 4:321-330 (1972)

(55) KAWAOI, A., NAKANE, P.K.: An improved method of conjugation of peroxidase with proteins
Fed. Proc. 32:840 (1973)

(56) SEIDL, S., KÜHNER, J., TRAUTMANN, L., PADE, K.: Hepanostika-Enzym-Immuno-Assay (EIA) für die Bestimmung von HBsAG im Serum oder Plasma. Der Nachweis von HBsAG bei Blutspendern

(57) LANGE, W., KÖHLER, W., APODACA, J., OTT, A., SUCKER, U.: Der Nachweis von HBsAG mit dem Hepanostika-Test, einem Enzymimmunoassay.

(58) GERLICH, D., STAUDE, D., THOMSON, R.: Vergleich von Radiojod- und Peroxidase-markierten Antikörpern zum Nachweis von HBsAG im Festphasensystem
Ärztl. Labor 23:377-384 (1977)

(59) OVERBY, L.: Persönliche Mitteilung

Lebenslauf

Am 7.5. 1954 wurde ich in Düsseldorf geboren als Sohn von Franz Luxem und seiner Ehefrau Rosemarie geb. Lückerath.

Von 1960 - 1964 besuchte ich die Katholische St. Franziskus-Grundschule in Düsseldorf und von 1964 - 1972 das Städtische Rethelgymnasium, auf dem ich 1972 das Abitur bestand.

Nach der Reifeprüfung leistete ich dem Militärdienst in der Sportkompanie der Bundeswehr-Luftwaffe in Porz-Wahn ab.

Zum Sommersemester 1973 wurde ich zum Studium der Humanmedizin vom Wehrdienst befreit.

Mein ganzes Medizinstudium verbrachte ich an der Universität Düsseldorf, an der ich 1975 die ärztliche Vorprüfung, 1976 das erste Staatsexamen, 1978 das zweite Staatsexamen und im Herbst 1979 das dritte Staatsexamen bestand.

Im November 1979 erhielt ich die Approbation zum Arzt.

Seit dem 1.1. 1980 arbeite ich als Assistenzarzt am Städtischen Krankenhaus Düsseldorf-Benrath in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin.